

**УНИВЕРЗИТЕТ „СВ. КИРИЛ И МЕТОДИЈ“
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ - СКОПЈЕ
ИНСТИТУТ ЗА СУДСКА МЕДИЦИНА,
КРИМИНАЛИСТИКА
И МЕДИЦИНСКА ДЕОНТОЛОГИЈА**



Д-Р РЕНАТА ЈАНКОВА - АЈАНОВСКА

***АНАЛИЗА НА МИТОХОНДРИЈАЛНА ДНК
(мтДНК) ОД БИОЛОШКИ МАТЕРИЈАЛ ВО
ФОРЕНЗИЧКИТЕ ИСПИТУВАЊА***

-докторска дисертација-

Скопје, 2015 година

МЕНТОР

Проф. д-р Алексеј Дума

Лектура

Весна Илиевска - Цветановска

Во оваа прилика сакам да изразам огромна благодарност до мојот ментор, проф. д-р Алексеј Дума, за идејата и поддршката да се изработи докторска дисертација од областа на форензичката генетика, како и за помошта и корисните совети кои ми ги даде во текот на изработката на докторската дисертација.

Голема благодарност му изразувам на проф. д-р Walther Parson од Innsbruck, Австрија, за соработката и помошта при изработката на институционалната студија од докторската теза.

Посебна благодарност му изразувам на мојот сојуз Ташко и на моите родители за разбирањето и креативната поддршка.

Исто така, им се заблагодарувам на сите колеги од Стручниот колеџум на Институтот.

СОДРЖИНА

АПСТРАКТ	I
SUMMARY	II
I. ВОВЕД	1
1. Форензичко профилирање на ДНК	1
2. Анализа на митохондријална ДНК (мтДНК) во форензиката	2
2.1. Карактеристики на мтДНК	3
2.1.1. Голем број на копии	3
2.1.2. Наследување од мајката	4
2.1.3. Отсуство на рекомбинација	5
2.2. Структура на мтДНК-геномот(мтГеном)	6
3. Референтна секвенца на човечката мтДНК	9
4. Хетероплазмија	11
5. Номенклатура на секвенцата на мтДНК	15
6. Анализа на мтДНК во форензички случаи	17
7. Различна примена на мтДНК-типизацијата	18
8. Популациски бази на податоци	19
8.1. EMPOP	20
8.2. мтДНК-хаплогрупи	20
II. МОТИВ ЗА ИЗРАБОТКА НА ДОКТОРСКАТА ДИСЕРТАЦИЈА	21
III. ЦЕЛ НА ИСТРАЖУВАЊЕТО	22
IV. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ	24
1. Популациони групи	24
2. Материјал	25
3. Методи	25
3.1. Изолација на мтДНК	26
3.2. Амплификација на мтДНК со PCR-реакција	28
3.2.1. Проверка на PCR-продуктите на агарозен гел	31
3.3. Прочистување на амплификациони продукти	32

3.3.1. Вишок прајмери и dNTP-а	32
3.3.2. Неспецифични производи на PCR	32
3.4. Секвенционирање на мтДНК	34
3.5. Прочистување на секвенционираниите продукти	36
3.6. Капиларна електрофореза	37
4. Софтверска анализа на резултатите од секвенционирање на мтДНК....	38
4.1. Анализа на резултатите од секвенционирање на мтДНК и одредување на мутации (полиморфизми)	38
4.2. Статистичка анализа на резултатите	40
4.3. Одредување на хаплогрупи	42
V. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА	44
1. мтДНК-податоци за испитаниците од три популациони групи во Република Македонија	44
1.1. Анализа на разликите на мтДНК кај испитаниците	61
2. Анализа на форензички случаи во тек на изработката на докторската дисертација	64
2.1. Идентификација на леш со напреднати трулежни промени... ..	64
2.2. Утврдување на прв степен крвно сродство	68
VI. ЗАКЛУЧОЦИ	70
VII. ЛИТЕРАТУРА	72

Апстракт

Митохондријалната ДНК (мтДНК) е мала кружна молекула чии карактеристики, како што се наследувањето од мајката, големиот број на копии, отсуството на рекомбинација и големата застапеност на полиморфизми низ контролниот регион од молекулата, ја прават погодна за форензички анализи. Човечката митохондријална ДНК првпат била секвенционирана во 1981 година во лабораторијата на Frederick Sanger во Cambridge, Англија. Во 1999 година била ревидирана и денес се користи како референтна секвенца при анализите на мтДНК, означена како ревидирана Cambridge-референтна секвенца (rCRS). Анализата на хиперваријабилните региони на мтДНК, посебно HV1 и HV2-регионите како најполиморфни, се применува во многу форензички лаборатории во светот за решавање на форензички случаи каде што количеството на изолираната ДНК е многу мало или каде што поради недоволен број на референтни примероци за споредба е потребно да се вклучат и други ДНК-маркери како што е мтДНК.

Популациската база на податоци игра значајна улога за попрецизно статистичко пресметување на веројатноста кога добиениот хаплотип од примерокот што се испитува се поклопува со тој од референтниот примерок. Од овие причини, лабораторијата каде што се вршат генетски анализи треба да има своја база на податоци од популацијата која живее во земјата каде што работи лабораторијата.

Во оваа докторска теза беа анализирани вкупно 444 примероци од три различни етнички групи (Албанци, Турци и Роми) кои живеат на територијата на Република Македонија. Кај сите примероци беше одредена нивната хаплогрупа врз основа на заеднички мутации во контролниот регион на мтДНК. Беа забележани разлики меѓу мтДНК-хаплогрупите меѓу одделни групи. Резултатите покажаа висока фреквенција на хаплогрупата H12 кај Албанците со 8,78%, помала кај Турците со 3,3%, додека хаплогрупите M5a1 и H7a1a беа најзастапени кај ромската популациска група со 13,7% и 10% соодветно, но беа ретки кај претходните две групи.

Оваа разлика во честотата на хаплогрупите укажува на потребата од посебна база на податоци за форензички цели.

Популациската база на податоци ќе биде достапна на EMPOP под пристапните броеви: EMR00644 за Албанците, EMR00645 за Ромите и EMR00646 за Турците. При изработката на докторската дисертација, со примена на мтДНК-анализа беа решени два форензички случаја: случај на идентификација на трулежно променето НН тело и утврдување на биолошко сродство сестра-брат.

Клучни зборови: мтДНК, EMPOP, хаплогрупи, Албанци, Турци, Роми, форензичка генетика.

Summary

Mitochondrial DNA (mtDNA) is a small circular molecule whose characteristics such as maternal inheritance, high copy number, lack of recombination and accumulation of polymorphism throughout the control region are widely used for forensic analysis. Human mtDNA was first sequenced in 1981 in Frederick Sanger's laboratory in Cambridge, England. In 1999 the sequence was re-sequenced and such as is used as a reference sequence for mtDNA analysis. This sequence is referred to as the revised Cambridge Reference Sequence (rCRS). Analysis of mtDNA hypervariable regions especially the most polymorphic ones such as HV1 and HV2 are used in many forensic laboratories worldwide for solving forensic cases where the amount of extracted DNA is very small, or where lack of reference samples for comparison asks for inclusion of additional DNA markers such as mtDNA.

Population database plays an important role in estimating the expected frequency of mtDNA haplotypes that are observed in analysed sample which match with reference sample. For this reason a laboratory working with DNA or mtDNA should have its own data base from the population in the country the laboratory works.

In this PhD thesis a total of 444 individuals representing three different ethnic groups (albanians, turks and romanes) in the Republic of Macedonia were sequenced in the mitochondrial DNA control region. All samples were determined for haplogroups according to common mutations in the mtDNA control region. The mtDNA haplogroup composition differed between the three groups. Our results showed relatively high frequencies of haplogroup H12 in albanians (8.78%) and less in turks (3.33%), while haplogroups M5a1 and H7a1a were dominant in romanes (13.7% and 10%, respectively) but were rare in the former two. This highlights the importance of regional sampling for forensic mtDNA databasing purposes.

This population data will be available on EMPOP under accession numbers EMP00644 (albanians), EMP00645 (romanes) and EMP00646 (turks). While working on a PhD thesis two forensic cases were solved with implementation of mtDNA analysis.

One case was identification of putrefied body and the other was testing for sister-brother relationship.

Keywords: mtDNA, EMPOP, haplogroups, albanian, turks, romanies, forensic genetics

АНАЛИЗА НА МИТОХОНДРИЈАЛНА ДНК (мтДНК) ОД БИОЛОШКИ МАТЕРИЈАЛ ВО ФОРЕНЗИЧКИТЕ ИСПИТУВАЊА

I. ВОВЕД

1. *Форензичко профилирање на ДНК*

Наследниот материјал кај човекот, дезоксирибонуклеинската киселина – ДНК (англ. *Deoxyribonucleic acid-DNA*), преку кодирачкиот дел на својата секвенца учествува во одредувањето на фенотипските карактеристики кај човекот, додека некодирачкиот дел или интергенските секвенци, освен нивното еволутивно значење, преку единственоста на секвенците кај секој поединец имаат важна улога во форензичките испитувања.

Отчитувањето на ДНК, или профилирањето на ДНК (англ. *DNA typing, profiling*), првпат било опишано во 1985 година од страна на англискиот научник Alec Jeffreys [1], кој докажал дека одредени региони на ДНК содржат ДНК-секвенци кои се повторуваат различен број пати и бројот на повторувањата се разликува помеѓу индивидуите. Со воведувањето на техника за испитување на варијациите на овие повторувања по должината на ДНК, д-р Jeffreys направил тест за утврдување на човечкиот идентитет. Овие повторувачки региони се познати како повторувачки тандеми во различен број (англ. *Variable Number of Tandem Repeat s- VNTR*). Техниката што ја користел д-р Jeffreys за испитување на овие VNTR била наречена *рестриктивни фрагментни должински полиморфизми* (англ. *Restriction Fragment Length Polymorphism-RFLP*), кои се добиваат по третирање на ДНК-молекулата со т.н. рестрикциони ензими кои ја сечат молекулата на ДНК на одредени места каде што се наоѓаат полиморфните нуклеотиди. Оваа RFLP-метода првпат била употребена за решавање на случај на англиски имигрант [2], а подоцна за решавање на случај на двојно убиство [3]. Оттогаш користењето на ДНК-анализата била широко прифатена за утврдување на идентитетот. Недостатокот на RFLP-техниката, а тоа е потребата од големо

количество на ДНК, бил надминат со воведување на нова техника наречена реакција на полимеризација, умножување на синџирот на ДНК или PCR (англ. *Polymerase Chain Reaction*) [4], со што можат да се направат неколку милиони копии на ДНК од само една молекула. За ова откритие научникот Kary Mullis во 1995 година добил Нобелова награда.

Анализата на ДНК денес е неопходен и рутински дел од модерната обработка на форензичките случаи, користејќи ја исклучително чувствителната техника заснована на PCR, за анализа на биолошките траги со исклучително мало количество на доказен материјал ДНК, како што се: плунка на догорчињата од цигари, епителни клетки од кожата останати на предмети по контакт со нив или влакна. Форензичката обработка на случаи во ДНК-лабораториите се врши со примена на комерцијални китови за анализа на автозомални STR (англ. *Short Tandem Repeat*) мултиплексни маркери (PCR-реакција во една епрувета во која се амплифицираат повеќе локуси), автозомални SNP-ови (англ. *Single Nucleotide Polymorphism*), маркери на Y и X-хромозомите и со директно секвенционирање на митохондријална ДНК - мтДНК. Постојните бази на ДНК-податоци можат брзо да бидат пребарани за пронаоѓање на евентуално совпаѓање со ДНК-профилот добиен од биолошка трага најдена на местото на настанот. Денес во Европа постојат голем број на форензички лаборатории и приватни лаборатории за утврдување на татковство, во кои се изведуваат стотина илјади ДНК-тестови годишно. Бројот на лабораториите кои вршат ДНК-анализа се повеќе расте, паралелно со растот на популарноста на оваа техника во службите на безбедносниот систем на државата.

Анализата на ДНК во судската медицина се користи во обработка на криминалистички траги, утврдување на идентитет на лица и во докажување на биолошко сродство.

2. *Анализа на митохондријална ДНК (митДНК) во форензикаџа*

Отчитувањето на STR ДНК-маркерите е поекономично и поедноставно во споредба со анализата на митохондријалната ДНК. Сепак, јадрените ДНК-маркери не можат секогаш да дадат резултати, посебно таму каде што

биолошките примероци не содржат доволно количество на јадрена ДНК. Во вакви случаи се применува анализа на мтДНК [5]. Митохондријалната ДНК се наоѓа во клеточните органели - митохондрии чија основна функција е производство на енергија (создавање на високоенергетско соединение АТР - аденозин трифосфат) по пат на оксидативна фосфорилација, но во нив се случуваат и други биохемиски процеси важни за животот на клетката.

Постојат две теории кои го објаснуваат настанувањето на митохондријалниот геном кај еукариотите (организми кои се состојат од една или повеќе клетки кои имаат јадро и органели ограничени со мембрана). Според едната теорија, геномот на митохондриите настанал со одвојување на дел од јадрениот геном кој потоа бил затворен со мембрана [6], а другата теорија е ендосимбиотска, односно, според неа, денешните митохондрии настанале од бактериски предок (прокариот - организам кој нема со мембрана оформено јадро и нема органели), кој во одреден период од времето формирал симбиоза со предок на еукариотски организам [7,8] откако бил проголтан од еукариотскиот организам, а потоа бил задржан поради заедничкиот интерес во симбиотската врска; со текот на времето ја изгубил способноста да функционира како самостоен организам, а геномот значително ја изгубил својата функција. Така, денес, синтезата на голем број протеини на митохондриите се кодира од јадрената ДНК [9]. Она што останува во човечките митохондрии е кружен геном со големина од ~16569 базни пара (bp), кој содржи 37 густо спакувани гени кои кодираат синтеза на продукти што се користат во процесот на оксидативна фосфорилација.

2.1. Карактеристики на мтДНК

2.1.1. Голем број на копии

Основната карактеристика која овозможува добивање на митохондријална ДНК (мтДНК) од деградирани биолошки примероци или, пак, од ткива кои не содржат јадро, како што е случај со влакна од коса без корен, е големиот број на копии на мтДНК во клетките во споредба со јадрената ДНК од која се амплифицираат кратки повторувачки тандеми STR-и. Иако јадрената ДНК содржи многу повеќе информации (3.2 милијарди базни пара од секој родител), во клетката има само две копии од неа - една од мајката, друга од

таткото, додека мтДНК, која е мал геном и сочинува само 0,25% од целокупната ДНК во клетката, е застапена во неколку илјади копии во клетката. Се смета дека просечно има 4 - 5 копии на мтДНК-молекули во една митохондрија, а измерен е опсег од 1 до 15 мтДНК-молекули [10]. Бидејќи секоја клетка содржи стотина до илјада митохондрии [11], во една соматска клетка може да има неколку илјади мтДНК-молекули. Сепак, во најголем број на соматски клетки, бројот на копии на мтДНК е околу 500 [10]. Големiot број на мтДНК-молекули овозможува поголем успех (во споредба со маркерите на јадрената ДНК) со биолошките примероци кои можат да бидат оштетени, на пример со топлина или влага. Во табела 1 се дадени некои од основните разлики меѓу јадрената и митохондријалната ДНК.

Табела 1. Споредба меѓу човечката јадрена ДНК и митохондријална ДНК

Карактеристики	Јадрена ДНК	Митохондријална ДНК(мтДНК)
Големина на геномот	≈3,2 милијарди bp	≈16,569 bp
Копии во клетка	2 (по една од секој родител)	може да биде >1000
Процент на целокупна ДНК	99,75%	0,25% по клетка
Структура	линеарна (спакувана во хромозоми)	циркуларна
Се наследува од	татко и мајка	мајка
Хромозомско спарување	диплоидно	хаплоидно
Генерациско рекомбинирање	да	не
Репликациска корекција	да	не
Единственост	единствена кај индивидуа (освен кај еднојајчени близнаци)	не е единствена кај една индивидуа (иста е кај роднини по мајка)
Стапка на мутации	ниска	висока

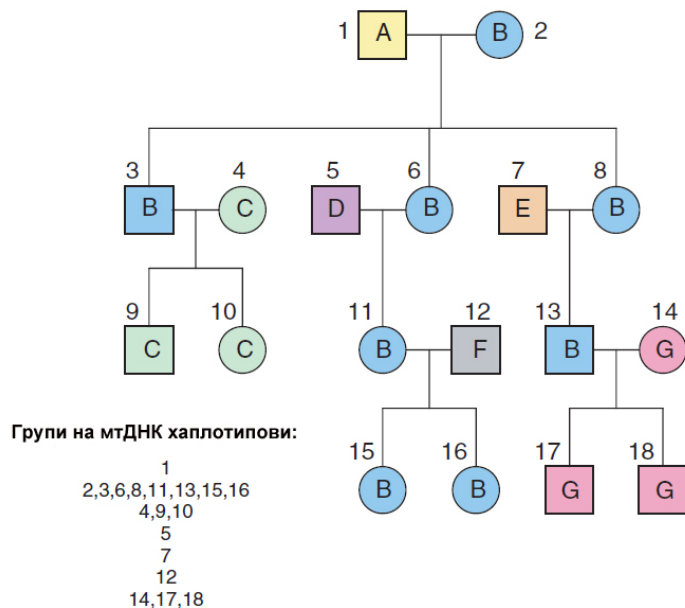
2.1.2. Наследување од мајката

Човечката митохондријална ДНК се наследува од мајката. Основна причина за тоа е што сперматозоидите содржат само неколку копии на митохондријална ДНК во споредба со илјадниците копии на мтДНК во јајце-клетката [12]. Меѓутоа, покрај разликата во бројот на мтДНК-молекули, се смета дека има и посебен механизам со кој се елиминираат и неколкуте мтДНК-молекули од таткото при спојување на сперматозоидот со јајце-клетката. Иако овој механизам на елиминација на мтДНК од таткото не е сосема разјаснет, јасно е дека од практична гледна точка при форензичко тестирање на мтДНК, таа покажува карактеристики на мајчино наследување. Parson и соработниците

испитувале и направиле споредба на 69 пара татко-дете и во ниту еден случај не докажале секвенца на мтДНК од таткото кај детето со користење на техника на директно секвенционирање на PCR-амплифицирана мтДНК [13]. Всушност, мајката ја предава својата мтДНК на потомците, па затоа сите деца и роднини по мајчина линија имаат идентична мтДНК-секвенца, што значи дека мтДНК-хаплотипот не е единствен кај една индивидуа.

Бидејќи и подалечни роднини по мајчина линија можат да поседуваат ист мтДНК-тип, анализата на мтДНК го зголемува бројот на корисни референтни примероци кои можат да се користат за да се потврди идентитетот на исчезнатото лице.

Пример за фамилијарно педигре со наследување на мтДНК од мајката е прикажан на слика 1. Во овој пример, единствени мтДНК-типови постојат кај индивидуите со број 1, 5, 7 и 12. Лицето 16 поседува мтДНК-хаплотип како седум други прикажани индивидуи, односно индивидуите со број 2, 3, 6, 8, 11, 13 и 15.



Слика 1. Илустрација на наследување на мтДНК од мајка кај 18 индивидуи во хипотетски дадено педигре. Со квадрати се означени машките лица, а со кругови женските. Секој посебен (различен) мтДНК-хаплотип е претставен со различна буква.

2.1.3. Оџсусџво на рекомбинација

Митохондријалната ДНК не подлежи на рекомбинација и ова се сметало за правило сѐ до 1999 година, кога биле објавени три публикации кои сугерираат на можноста за рекомбинација на мтДНК или наследување на мтДНК од таткото [14, 15, 16]. Наследувањето на мтДНК од таткото е објавено кај глувци [17]. Со публикациите за рекомбинација на мтДНК, авторите предизвикале бранување во круговите на научници што се занимавале со форензичка и популациона генетика на мтДНК [18, 19, 20, 21, 22]. Еден од авторите во публикацијата каде што се наведува рекомбинацијата подоцна ја повлекол публикацијата поради проблеми со податоците [23]. Бидејќи нема директен доказ кој би го поддржал настанувањето на рекомбинација било во или помеѓу мтДНК-геномите, оваа тема е ставена во мирување за повеќето научници од оваа област [24, 25, 26, 27].

Меѓутоа, постои еден публикуван извештај за трансмисија на татковиот тип на мтДНК во скелетната мускулатура [28]. Но, овој тип на мтДНК од таткото не бил најден во ниту едно друго ткиво. Слични други испитувања кај индивидуи кои имаат слично мускулно заболување не нашле доказ за трансмисија на мтДНК од таткото [29, 30, 31]. Илјадници мтДНК-примероци во последните три декади го потврдуваат начинот на наследување од мајката [32], така што може со сигурност да се заклучи дека централната догма за мајчиното наследување на мтДНК останува и понатаму.

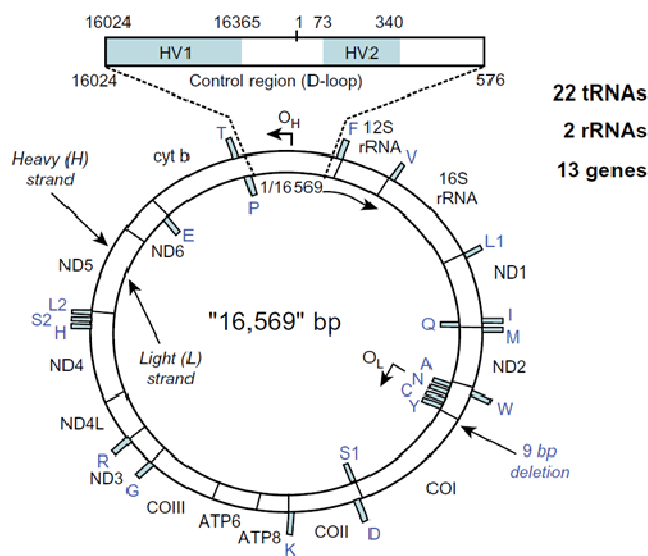
Бидејќи нема рекомбинација на митохондријалната ДНК, таа се дефинира како секвенца или хаплотип и се третира како единечен локус.

2.2. Сџрукџура на мџДНК-џеномоџ (мџГеном)

Митохондријалната ДНК е геном со кружна форма, изграден од два синџира (тежок и лесен синџир) со големина од приближно 16,569 базни пара, но вкупниот број на нуклеотиди во мтДНК-геномот (мтГеном) може да варира поради мали инсерции или делеции. На пример, динуклеотидното повторување на позиција 514 до позиција 524, кај повеќето индивидуи е ACACACACAC или (AC)₅, но е забележано дека варира од (AC)₃ до (AC)₇ [33, 34]. Најголемиот дел од мтГеномот кодира 37 генски продукти кои се користат во процесот на оксидативна фосфорилација или во производството на енергија во клетката. Овие 37 “транскрипциони” гени на мтДНК, кои се наоѓаат во кодирачкиот

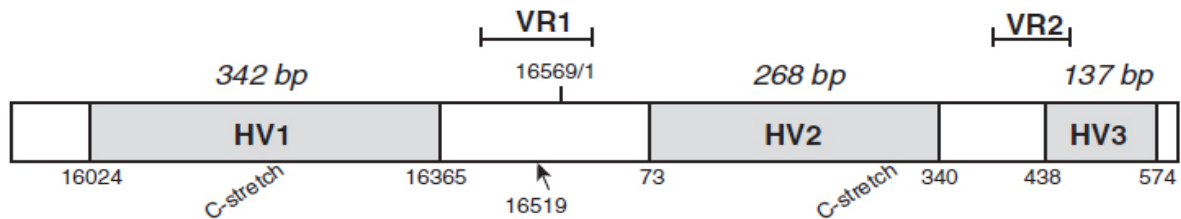
регион, кодираат: 13 протеини, 2 рибозомални РНК (rRNA) и 22 транспортни РНК (tRNA) молекули. Асиметричната дистрибуција на нуклеотиди во мтГеномот ги разликува синџирите на мтДНК како ”лесен” (light, L-strand) и ”тежок”(heavy, H-strand) синџир при одвојување на мтДНК-молекулите со градиент во алкален CsCl [35]. Тешкиот или H-синџир содржи поголем број на гванин нуклеотиди, кои имаат релативно поголема молекуларна маса од четирите нуклеотиди (A,T,C и G), во споредба со лесниот L-синџир. Вкупно 28 генски продукти се кодирани од H- синџирот, додека L- синџирот кодира 8 тРНК и ензим наречен ND6. Гените во кодирачкиот регион на мтДНК се економично густо спакувани без интрони само со 55 нуклеотиди во кодирачкиот регион на позиција 15447 кои не се користат за транскрипција на протеини, рРНК или тРНК-молекули.

Геномот на митохондријална ДНК содржи и еден контролен регион (англ. *control region-CR*), кој уште се нарекува и D-петелка (англ. *D-loop*) поради формата што се следи со електронски микроскоп за време на репликација на мтДНК. Репликацијата на мтДНК почнува со H-синџирот во контролниот регион. На слика 2 е прикажан кружниот геном на мтДНК, со двата синџира, регионите со протеин-кодирачките гени и контролниот регион.



Слика 2. Илустрација на кружниот мтДНК-геном (мтГеном) и проширен дијаграм на некодирачкиот регион

Контролниот регион не кодира синтеза на генски продукти затоа уште се нарекува "некодирачки регион". Долг е 1122 базни пара, почнува од нуклеотид со позиција 16024 - 16569, па продолжува од 1 до позиција 576 (слика 3).



Слика 3. Приказ на хиперваријабилните региони (HV) од контролниот регион на мтДНК. Означени се и варијабилните региони (VR) кои ретко се користат. Контролниот регион ги опфаќа позициите од 16024 до 16569, потоа продолжува од позиција 1 до позиција 576. Во контролниот регион се наоѓаат три хиперваријабилни региони (HV). Хиперваријабилниот регион HV1 (HV1) се протега од нуклеотидна позиција 16024 до 16365 (342bp), HV2 се протега од позиција 73 до позиција 340 (268bp) и HV3, кој поретко се испитува во форензичките случаи, се протега од 438 до 574 (137bp).

Нумерирањето на базите на мтДНК-геномот започнува во средината на контролниот регион каде што е позиција 1, а потоа продолжува низ целиот геном и завршува со позиција 16569. Тоа е произволно, одредено од местото на дејство на *MboI*-рестрикциониот ензим на L-синџирот во контролниот регион, како што е опишано во трудот на Андерсон и соработниците [36]. Позицијата 1 не го означува почетокот на репликација, туку почетокот на читање на секвенцата.

Фокусот на форензичните ДНК-анализи е според двата хиперваријабилни региона во контролниот регион HV1 и HV2, каде што фреквенцијата на мутациите е најголема, а повремено е вклучен и третиот HV3-регион. Хиперваријабилниот регион 1 (HV1) се протега од позиција 16024 до позиција 16365, а хиперваријабилниот регион 2 (HV2), од позиција 73 до позиција 340 [37]. Третиот хиперваријабилен сегмент, HV3 [38,39], се протега од позиција 438 до позиција 574 [40, 41, 42]. Големината на сегментите кои се анализираат може да варира од студија до студија, во зависност од применетите прајмери (англ. *primer*), но опфатените секвенци не треба да се премногу кратки за да не се испуштат некои од полиморфизмите во хиперваријабилните региони.

Полиморфизми или мутации можат да настанат на кое било место низ целиот геном на мтДНК, но најголем број од нив се забележуваат во хиперваријабилните региони, во таканаречените “hot spots”, каде што се групираат повеќето од варијациите [43]. Се смета дека стапката на мутации е 10 пати поголема кај мтДНК отколку кај јадрената ДНК. Причината за поголемиот број на мутации кај мтДНК е постоењето на помал број механизми за поправка на настанатите мутации (DNA repair mechanisms), како и недостаток на механизам на ДНК-полимеразата за повторно читање на секвенцата (proofreading).

Зголемената варијабилност на секвенцата на мтДНК е корисна за повеќето апликации каде што се врши човечка идентификација. Во споредба со кодирачкиот регион, контролниот регион поради неговото намалено учество во природната селекција како некодирачки регион, покажува значителни разлики меѓу индивидуите, посебно по должина на HV1 и HV2-регионите. Од овие причини, форензичкото ДНК-тестирање се должи на разликата во секвенците во хиперваријабилните региони на контролниот регион [44].

За HV1 и HV2-регионите, комбинирани заедно, кавкаските Европејци се разликуваат меѓу себе просечно на секој осми нуклеотид. Всушност, пресметано е дека контролниот регион на мтДНК се разликува за околу 1-2% или 7 - 14 нуклеотиди од 610 bp на HV1 и HV2-регионите заедно, помеѓу несродни индивидуи [45].

Постојат повеќе методи за одредување на варијациите на мтДНК кои можат да се користат за исклучување на примероците што не се совпаѓаат. Овие методи обично се фокусирани на одредување на варијациите на хиперваријабилните “hotspots” и вклучуваат употреба на олигонуклеотидни проби, специфични за одредена секвенца (англ. *Sequence-specific oligonucleotide probes*) [46], мини-секвенционирање (англ. *mini-sequencing*) [47], денатурирачка градиент електрофореза (англ. *denaturing gradient electrophoresis*), анализа со рестрикциони ензими за HV1-регионот [48] и анализа со реверзен дот блот (англ. *dot blot*) [49]. Анализата на мтДНК најчесто се изведува со методата на секвенционирање по Сангер [50, 51].

3. Референтна секвенца на човечката мтДНК

Човечката мтДНК првпат била секвенционирана во 1981 година во лабораторијата на Frederick Sanger во Кембриџ, Англија, а секвенцата е опишана во трудот на Андерсон и соработниците [36]. Повеќе години, оригиналната "Андерсонова" секвенца (означена по името на првиот автор по алфабетски редослед од истражувачката група на Сангер) била референтна секвенца со која биле споредувани новите секвенци. Андерсоновата секвенца, исто така, се нарекува и Кембриџ - референтна секвенца (CRS). Во 1999 година, оригиналниот материјал употребен од Андерсон и соработниците за да ја создадат CRS, бил ресеквенциониран [52] и е означен како ревидирана Кембриџ - референтна секвенца (англ. *revised Cambridge Reference Sequence-rCRS*). Секвенцата од 1981 година потекнува од лице од европско потекло, меѓутоа содржи и секвенци од ХеЛа и говедска секвенца за да се пополнат празнините кои биле резултат на сè уште недоволно развиената процедура за секвенционирање на ДНК. Со подобрување на технологијата на секвенционирање на ДНК во наредните две декади, научниците сметале дека сите грешки треба да се поправат за да се овозможи широка употреба на референтната секвенца во иднина.

Повторната анализа на секвенцата ги потврдила сите освен 11 нуклеотиди од оригиналната секвенца (табела 2). Една од овие разлики била делеција на еден цитозин на позиција 3107. Делецијата на С-нуклеотидот на позиција 3107 значи дека референтниот мтГеном би бил со должина од 16568 bp, но претходното нумерирање е задржано со додавање на едно "N" на местото на делецијата 3107. Со тоа, Andrew и соработниците препорачале да се задржи претходното нумерирање и за ревидираната Кембриџ - референтна секвенца со "N" место на позиција 3107. Ревидираната Кембриџ - референтна секвенца од "16569 bp" е достапна на MITOMAP website: <http://www.mitomap.org/mitoseq.htm> [53]. Дополнителни седум нуклеотидни позиции: 263A, 311-315CCCCC, 750A, 1438A, 4769A, 8860A и 15326A се покажало дека се точни, но претставувале ретки полиморфизми. Останатите три се нуклеотиди (14272, 14365 и 14766), инсертирани од говедската секвенца и од ХеЛа-клетките. За среќа, не биле забележани грешки во контролниот регион, така што оригиналната Андерсонова секвенца била идентична со ревидираната Кембриџ-секвенца по должина на HV1 и HVII-регионите кои имаат широка примена во форензичките

анализи. Оваа ревидирана Кембриџ-референтна секвенца (rCRS) сега претставува прифатен стандард за споредба и е достапна во GenBank како NCBI-референтна секвенца NC_012920.1.

Табела 2. Споредба на нуклеотидните разлики забележани помеѓу оригиналната Кембриџ - референтна секвенца и ревидираната Кембриџ - референтна секвенца

Нуклеотидна положба	Регион на мтГеном	Оригинална CRS	Ревидирана CRS (rCRS)
3106-3107	16S rRNA	CC	C
3423	ND1	G	T
4985	ND2	G	A
9559	COIII	G	C
11335	ND4	T	C
13702	ND5	G	C
14199	ND6	G	T
14272	ND6	G	C
14365	ND6	G	C
14368	ND6	G	C
14766	cyt b	T	C

4. Хетеролазмија

Хетероплазмијата претставува присуство на повеќе мтДНК-хаплотипови кај една индивидуа [54, 55]. Присуството на повеќе мтДНК-хаплотипови кај една иста индивидуа се должи на тоа што мтДНК-молекулите се реплицираат независно една од друга и не се стриктно врзани со митотичната или мејотичната клеточна делба, но и не подлежат на рекомбинација [56]. Во споредба со јадрената ДНК, контролниот регион на мтДНК покажува висока стапка на мутации [13]. Овие фактори се причина за можноста кај една индивидуа да се најдат различни популации на мтДНК-молекули, кои се реплицираат и подлежат на сегрегација независно едни од други.

Иако хетероплазмијата може да се пренесе од мајката на потомството [57], сепак сите мтДНК-варијанти не се пренесуваат на потомството. Постојат механизми кои го ограничуваат пренесувањето на мтДНК-варијантите помеѓу генерациите. Тоа е таканаречениот феномен на ”грло на шише” (англ. *Bottleneck*), кој настанува при оогенезата или раната ембриогенеза. Се смета дека големината на мејотичниот ”Bottleneck” е 2 до повеќе од 100 мтДНК-молекули за одредена трансмисија мајка-дете, со најчеста трансмисија на 3-20 молекули [58, 59].

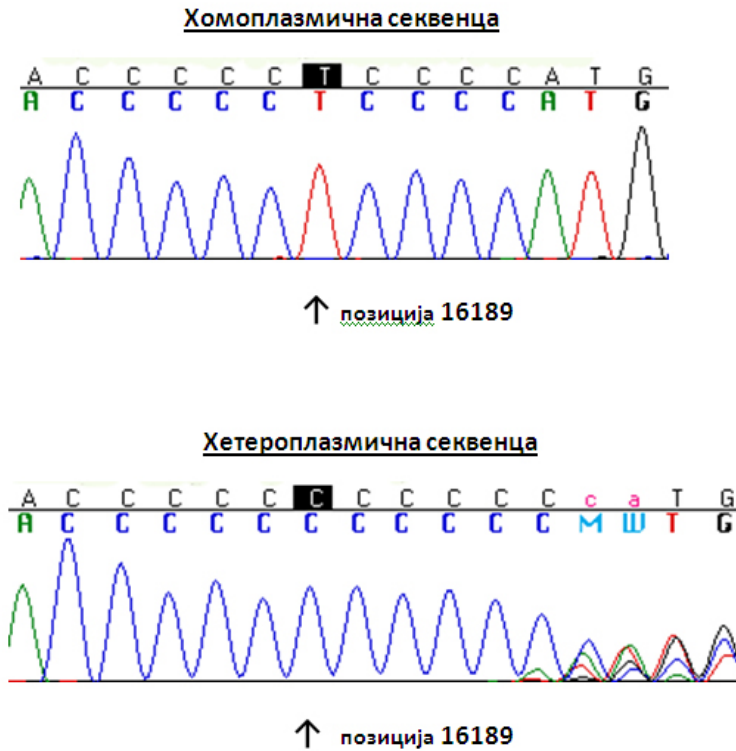
Хетероплазмијата може да се јави на неколку начини:

1. индивидуите можат да имаат повеќе од еден тип на мтДНК во едно ткиво;
2. индивидуите можат да имаат еден вид на мтДНК во едно ткиво, а друг тип во друго ткиво;
3. индивидуите можат да бидат хетероплазмични во едно ткиво, а хомоплазмични во друго ткиво [60].

Две или повеќе популации на митохондријална ДНК можат да се сретнат и во една клетка или во една митохондрија [61,62]. Се мисли дека сите индивидуи во некој степен се хетероплазмични, но во повеќето случаи тоа е под границата на детекција при анализата на ДНК-секвенцата [63,64,65,66]. За да биде детектирана мтДНК мутацијата мора да биде распространета со доволна фреквенција помеѓу мтДНК-молекулите во клетката.

Во литературата се опишани: точкеста и должинска хетероплазмичност [67]. Должинската хетероплазмичност обично се јавува околу хомополимерната С-низа во HV1-регионот на позиција од 16184 до 16193 и во HV2-регионот на позиција од 303 до 310. Полицитозинските низи во HV1-регионот се некогаш тешки за интерпретација. Овие региони, околу 16184-16193 се често хетероплазмични, односно популации на мтДНК-молекули се разликуваат во бројот на цитозините во цитозинските низи. Во HV1-регионот, транзицијата на ”Т” на позиција 16189 во ”С”, како што може да се види на слика 4, доведува до формирање на ”С” низа која обично содржи 10 или 11 цитозини. Секвенцата што следува по ”С” низата не може понатаму да се анализира бидејќи е неподобна, затоа што полимеразата се обидува да секвенционира низа различни должински

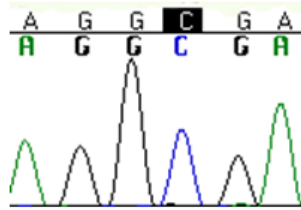
варијанти. Во вакви случаи, секвенционирањето со прајмер кој се врзува на 3' крајот од секвенцата овозможува читање на делот по цитозинската низа.



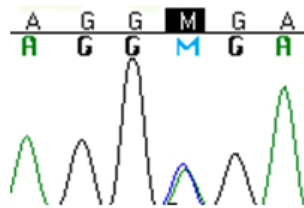
Слика 4. Пример за должинска хетероплазмија во секвенцата на мтДНК од примерок вклучен во популационата студија. Прикажани се нуклеотиди од позиција 16183 до позиција 16196 на мтДНК-геномот. Примерокот прикажан на долниот дел има цитозин - C на позиција 16189, со низата цитозини настанува должинска хетероплазмија. На горниот дел од сликата е прикажана хомоплазмична секвенца со тимин - T на позиција 16189.

Точкестата хетероплазмичност означува присуство на два нуклеотида на едно место, што доведува до појава на два преклопувачки пика во секвенцата на електроферограмот (слика 5). Во ваквите случаи, нуклеотидната позиција се смета за хетероплазмична доколку вториот пик е повеќе од 10% од висината на примарниот пик. Наодот на точкеста хетероплазмичност мора да биде присутен најмалку во двете реакции на секвенционирање, со "forward" и со "reverse" прајмерот. Хетероплазмичните позиции се означуваат со IUPAC- номенклатура (табела 3).

Хомоплазмична секвенца



Хетероплазмична секвенца



↑ позиција 186

C/A

Слика 5. Пример за точкеста хетероплазмичност во секвенцата на мтДНК од примерок вклучен во популационата студија. Прикажани се нуклеотиди од позиција 183 до позиција 188 на мтДНК-геномот. Примерокот прикажан на долниот дел од сликата има истовремено С и А нуклеотид на позиција 186. Во горниот дел од сликата е прикажана хомоплазмична секвенца.

Хетероплазмичноста на две места кај една индивидуа е позната како ”триплазмија” и е опишана во литературата [58], но се јавува со мала фреквенција за разлика од хетероплазмијата на едно место. Опишани се и поголем број на хетероплазмични места по должината на мтДНК кај една индивидуа [68], но стратегијата на секвенционирање може значително да влијае на добиениот резултат [69], како, на пример, можната контаминација во тек на амплификација со поголем број на циклуси. Кај една индивидуа се смета дека хетероплазмијата се движи со честота 2-8 % [70].

Иако постојат студии во кои е наведено дека фреквенцијата на хетероплазмиите може да се разликува кај различни видови на ткива, се смета дека хетероплазмијата е највисока во мускулното ткиво и дека статистички значајно се разликува кај различни возрастни групи, што сугерира дека хетероплазмијата се зголемува со возраста на човекот [71]. Сепак, други студии објавуваат податок дека хетероплазмијата останува стабилна во текот на

старењето на човекот, а поверојатно е дека се наследува отколку дека се зголемува со старењето.

Присуството на хетероплазмичност може да ја комплицира, но и да ја зголеми доказната вредност при форензичко тестирање и секогаш треба да се има предвид [72,73].

5. Номенклајџура на секвенцајџа на мтДНК

Означувањето на секвенцата на хиперваријабилните региони би било конфузно и тешко доколку би се наведувале сите бази во низата на секвенцата што се анализира. Затоа, постои друг пристап со кој се означуваат само базите што се разликуваат од Андерсоновата секвенца или од Кембриџ - референтната секвенца (CRS) [36]. Секој базен пар од оваа секвенца е означен со број. Андерсоновата секвенца е претставена како секвенца на лесниот синџир и се споредува со секвенцата на примерокот што се испитува. При читањето се наведуваат само базите кои се разликуваат од референтната секвенца, додека другите се подразбира дека се исти со тие на референтната секвенца. Разликите во однос на референтната секвенца се наведуваат на тој начин што се наведува редниот број на базниот пар каде што е разликата и се додава буква која ја означува базата. На пример, на местото 16311 во референтната секвенца се наоѓа базата Т (тимин), но кај некои лица на таа позиција може да има С (цитозин). Овој полиморфизам се означува како 16311С, а за останатите, ако не е наведена ознака, се подразбира дека се исти со референтната секвенца [74].

Инсерциите (вметнувања на бази) се означуваат со ставање на точка по позицијата на последната база која се поклопува со Андерсоновата секвенца, по што следува број. За прва инсерција се додава "1", за втора "2" и така натаму, а потоа се додава нуклеотидот кој е вметнат. На пример, ако базите по позиција 309 се поместени за еден додаден цитозин (С), инсертираната база ќе биде означена како 309.1 С. Ако се вметнати два С, се означуваат како 309.1 С, 309.2 С. За делециите (недостасување на база) се наведува позицијата каде што недостасува базата во однос на CRS по кое следува буквата D или "-" (на пр.349 D или 349-).

Базите кои се недвосмислено одредени се означуваат со одредена буква (А, С, Т, G). Базите кои не можат да бидат еднозначно одредени се означуваат со N.

На потврдените хетероплазмични позиции може да се примени номенклатура дадена од страна на Интернационалното здружение за општа и применета хемија (*International union of pure and applied chemistry-IUPAC*) за именување на бази. Доколку не е потврдена хетероплазмичноста, тогаш на таа позиција може да стои N. На потврдените позиции на двосмисленост (амбивалентност) можат да се користат IUPAC-овите кодови (Табела 2). На пример, A/G хетероплазмичност може да се означи и со N или со R.

Табела 3. IUPAC-кодови за именување на бази кога на иста позиција се наоѓаат повеќе од еден нуклеотид, односно при хетероплазмичност

IUPAC код	Комбинација на нуклеотиди
R	A/G
Y	C/T
K	G/T
M	A/C
B	C/G/T
D	A/G/T
H	A/C/T
V	A/C/G
S	G/C
W	A/T

Именувањето на секвенците на мтДНК врз основа на споредување со стандардната секвенца е едноставен начин на заеднички јазик да се опишат варијациите забележани во човечката популација. Опишаната номенклатура се користи широко во форензичките лаборатории [75,76].

Некои групи на научници користат филогенетски пристап во прикажување на номенклатурата на мтДНК-секвенцата [77,78]. Во иднина, проучувањето на низата со користење на целата мтДНК-секвенца [79,80] ќе овозможи отстранување на амбигвитетите и потенцијалните несовпаѓања кои се

појавуваат поради скратување на секвенцата на разликите со референтната секвенца, користејќи правило на хиерархија или филогенетски пристап.

6. *Анализа на мтДНК во форензички случаи*

Во последните неколку години биле изведени интересни историски идентификации со анализа на мтДНК, како што се: анализата на остатоците од гробот на незнајниот јунак од војната во Виетнам, каде што по анализа од шест скелетни примероци, ДНК-лабораторијата за идентификација на вооружените сили во Америка (англ. *Armed Forces DNA Identification Laboratory- AFDIL*), со секвенционирање на митохондријална ДНК и со споредба на резултатот со референтни примероци од седум фамилии, ги поврзале остатоците со една фамилија, односно било утврдено дека коскените остатоци му припаѓаат на војникот Michael Blassie [5,81]; идентификацијата на руската кралска фамилија [72, 73, 82], тврдењето на Anna Anderson Manahan дека е руската принцеза Анастасија било докажано дека е погрешно [83].

Митохондријалната ДНК има голема важност во форензичката генетика, бидејќи може ефикасно да се амплифицира од мали количества на биолошки примероци или деградиран биолошки материјал. Во случаи каде што количеството на изолираната ДНК е многу мало, веројатноста за типизација на мтДНК, поради големиот број на копии во клетките и поради нејзината кружна постабилна форма, е поголема од отчитувањето на маркерите на јадрената ДНК. Отпаднати влакна, коски, заби и други примероци кои се значително разградени, можат да бидат користени за мтДНК-анализа [84, 85, 86, 87].

Примената на анализата на мтДНК во форензичките испитувања се должи на предностите кои оваа анализа ги има во однос на јадрената ДНК, а тоа се големиот број на копии на мтДНК во една клетка, што овозможува анализа на стари деградирани примероци. Исто така, митохондријалната ДНК се наследува по мајчина линија, што овозможува идентификација на човечки остатоци со споредување на кој било роднина по мајчина линија. Пренесувањето на митохондријалната ДНК по мајчина линија е главно стабилно низ повеќе генерации, а биолошката релација помеѓу индивидуите меѓу кои се бара сродство може да се утврди со типизација на митохондријална ДНК дури и со исклучување

на неколку генерации. Анализата на мтДНК претставува комплементарна метода со останатите што се користат во форензичките генетски лаборатории, значително важна во некои случаи за добивање на потребната статистичка вредност >99,9% [88]. Секако, постојат и ограничувања на оваа техника, односно наследувањето по мајчина линија може да претставува проблем во криминалистичката обработка на случаи бидејќи ако се исклучи можна мутација, сите членови по мајчина линија ќе имаат ист хаплотип. При идентификација, значењето на совпаѓањето (англ. *matching*) на мтДНК-секвенцата зависи од случајот што се испитува, односно само одреден сплет на околности може да овозможи мтДНК-совпаѓањето да се смета за дефинитивно. Ова се случува кога групата на можни извори за споредба е затворена, односно кога примерокот за идентификација се поврзува со позната група на индивидуи.

Анализата на мтДНК бара многу повеќе работа и поголеми трошоци за разлика од отчитување на STR-ите, па затоа примената на мтДНК-анализа се користи само во форензички случаи каде што маркерите на јадрената ДНК не можат да дадат резултати или таму каде што процентот на добиената статистичка вредност од типизацијата на ДНК со стандардните методи е помала од 99,9%, па со вклучување на добиената статистичка вредност од анализата на мтДНК, може да се добие статистичка вредност еднаква или поголема од 99,9%, неопходно за постигнување на сигнификантност на добиениот резултат или при утврдување на мајчинство.

7. Различна примена на мтДНК-типизацијата

Варијациите во секвенцата на митохондријалната ДНК, освен во форензиката, интензивно се проучуваат и во неколку други дисциплини. Научниците од областа на медицината нашле поврзаност на некои заболувања со мутации во митохондријалната ДНК [89]. Во проучувањата на еволуцијата на човекот, научниците ја споредуваат секвенцата на хуманата мтДНК со секвенцата кај другите видови. Дobar пример за оваа апликација е одредувањето дека неандерталците не се директни предци на модерниот човек, утврдено при споредба на секвенцата на контролниот регион од прастари коски [90]. Молекуларните антрополози ги проучуваат разликите на мтДНК-секвенцата кај

различни популациони групи за да се проучи прашањето за потеклото и миграцијата на народите низ историјата [91]. Генетските генеалози со анализа на мтДНК и анализа на маркерите на Y-хромозомот се обидуваат да го утврдат потеклото на човекот [92].

8. Популациски бази на податоци

Студиите за варијации на хуманата митохондријална ДНК се основа во разбирањето на потеклото и еволутивниот развој на популационата генетика на модерниот *Homo sapiens* [93]. Наследувањето по мајчина линија, отсуството на рекомбинации и еволутивно големата стапка на мутации на мтДНК овозможуваат да се следи потеклото на човекот. За разлика од кодирачките делови на мтДНК, секвенцата на контролната регија поради намалениот еволутивен притисок врз неа покажува поголеми варијации во популацијата. Специфичната секвенцата на мтДНК воочена кај примерокот претставува **хаплотип**, додека хаплотипови кои носат исти мутации претставуваат **хаплогрупа**. Хаплогрупата може да содржи голем број на хаплотипови кои се поврзани со една или повеќе заеднички мутации на тој начин формирајќи супхаплогрупи. Хаплогрупите најчесто имаат регионална специфичност [94, 95, 96, 97, 98, 99, 100]. Со анализа на секвенцата на мтДНК кај различни популации и одредување на хаплогрупи добиени се популациски бази на податоци.

Популациските бази на податоци играат важна улога во одредувањето на очекуваната фреквенција на мтДНК-хаплотипот кој ќе биде откриен во форензичкиот случај кога мтДНК на осомничениот се совпаѓа со таа на биолошката трага. Големината на базата на податоци е важна бидејќи без рекомбинација помеѓу мтДНК-молекулите, мтДНК-секвенцата се третира како единечен локус (хаплотип наместо генотип). Податоците во популационите бази мораат да бидат со висок квалитет, што е особено важно за да се направи веродостојна проценка на честотата на случајното совпаѓање на добиените профили. Најголема база на податоци постои за полиморфизмите HV1/HV2, но и за сите мтГеном-варијации.

8.1. EMPOP

EMPOP претставува форензичка мтДНК-база на податоци [101]. Група луѓе се активно вклучени во развојот на висококвалитетна база на податоци за мтДНК за форензички цели, но и при апликација за човечка идентификација. Популациската база на податоци е достапна на интернет, на адресата <http://www.empop.org>. [102]. До октомври 2013 година се типизирани 34,614 хаплотипови, вклучувајќи ја и македонската популација. Податоците можат да се пребаруваат на интернет.

8.2. мтДНК-хаплогрупи

Со типизацијата на мтДНК-примероци кај различни популации, научниците забележале дека индивидуите можат да се групираат во хаплогрупи кои се дефинираат преку одредени полиморфни нуклеотиди [103,104]. Хаплогрупите се означени со букви. Хаплогрупите А, В, С, D, Е, F, G и М обично се однесуваат на азиските групи. Повеќето нативни Американци ги имаат хаплогрупите А, В, С и D. Хаплогрупите L0, L1, L2 и L3 се африкански, додека хаплогрупите H, I, J, K, T, U, V, W и X се поврзани со европската популација.

II. Мотив за изработка на докторската дисертација

Анализата на автозомните STR-и, која како метода е широко применувана во форензичките генетски лаборатории, е многу поедноставна за работа и поекономична во споредба со анализата на мтДНК. Јадрените ДНК-маркери, каде што влегуваат автозомните STR-и и анализата на X и Y-хромозомот, не можат секогаш да дадат резултат, на пример при анализа на стари деградирани примероци или отпаднати влакна или, пак, при недоволен број на референтни примероци за споредба или кога референтните примероци за споредба прескокнуваат неколку генерации. Во вакви случаи, анализата на мтДНК е неопходна.

Анализата на мтДНК за форензички испитувања, која подолго време се применува во форензичките ДНК-лаборатории во светот, кај нас во Република Македонија за првпат се вовеле и се изработува на Институтот за судска медицина, криминалистика и медицинска деонтологија при Медицинскиот факултет во Скопје. Оваа метода, иако нема широка примена во форензичките случаи како што е примената на STR-ите, усвојувањето и располагањето со методата за анализа на мтДНК овозможи решавање на случаи каде што не беше доволна анализата на STR-ите.

III. Цел на истражувањето

Целта на оваа студија или истражување беше да се одреди секвенцата на контролниот регион на мтДНК кај испитаници од три различни етнички групи: Албанци, Турци и Роми кои живеат на територијата на Република Македонија, а според демографските податоци добиени од регистарот од 2002 година за популацијата во Република Македонија, застапени се со 25,2%, 3,9% и 2,7% последователно, додека за македонската етничка група која е застапена со 64,2% постојат објавени податоци за контролниот регион на мтДНК [105].

Со анализата на најзастапените етнички групи во Република Македонија би се зголемила базата на податоци за фреквенцијата на хаплотиповите на мтДНК на популацијата во Република Македонија, што има значење во форензичките анализи.

Добиените резултати ќе бидат внесени во EMPOP [102] форензичка база на мтДНК-податоци. Оваа база на податоци се користи при статистичка обработка на резултати добиени од анализа на мтДНК кај испитаници кои живеат на територијата на Република Македонија. Бидејќи постојат разлики во застапеноста на хаплотиповите на мтДНК кај различни популации, податоците за една популација не можат да се користат при биостатистичка анализа на примероци од друга популација. Со постоењето база на податоци од различни популациски групи, се зголемува прецизноста во биостатистичката анализа на добиените резултати. Односно, преку користење на базата на податоци за одредена популација се добиваат корисни информации кои служат за одредување со поголема прецизност на веројатноста на припадност при поклопување на ДНК-профилот од биолошката трага најдена на местото на настанот со секвенцата на ДНК-профилот на осомничениот.

За биостатистичките анализи, секоја лабораторија мора да поседува податоци за генетските карактеристики на својата популација, односно за населението во државата во која таа лабораторија работи. Исто така, застапеноста во висок процент на одредени хаплотипови на мтДНК кај одредена популација, а нивното отсуство или застапеност со мала фреквенција во друга популација ја олеснува истрагата во врска со анализираниот настан.

Истражувањето во оваа студија опфати воведување и оптимизација на протоколот за изолација на мтДНК од различен биолошки материјал, примена на PCR-реакција оптимизирана за оваа анализа со избор на специфични прајмери за амплификација и секвенционирање на HV1 и HV2-регионите и на контролниот регион на мтДНК за популационата студија, реакција на секвенционирање на мтДНК и електрофореза на секвенционираниите продукти. Добиените резултати беа анализирани со примена на специфичен софтвер за анализа на секвенци и беа споредени со референтна секвенца. Резултатите од случаите беа статистички

обработени, а добиените хаплотипови од испитаниците во популационата студија беа групирани во хаплогрупи.

IV. Материјал и методи

1. Популациони групи

За изработка на докторската студија беа вклучени доброволни испитаници од три етнички групи кои живеат на територијата на Република Македонија, и тоа од албанската етничка група - 148 испитаници, од турската етничка група - 150 испитаници и од ромската етничка група - 146 испитаници, или вкупно 444 испитаници. Студијата е одобрена од Етичкиот комитет при Универзитетот "Св. Кирил и Методиј" во Скопје со број 03-5904/2 од 1.2.2013, број на сесија XXVI. Сите учесници пред да бидат вклучени во популационата студија беа усно и писмено информирани за научната студија, по што секој од испитаниците даде писмена согласност доброволно да учествува во студијата и да даде примерок брис од усна слuzница за мтДНК-анализа која ќе биде употребена за изработка на популациона студија.

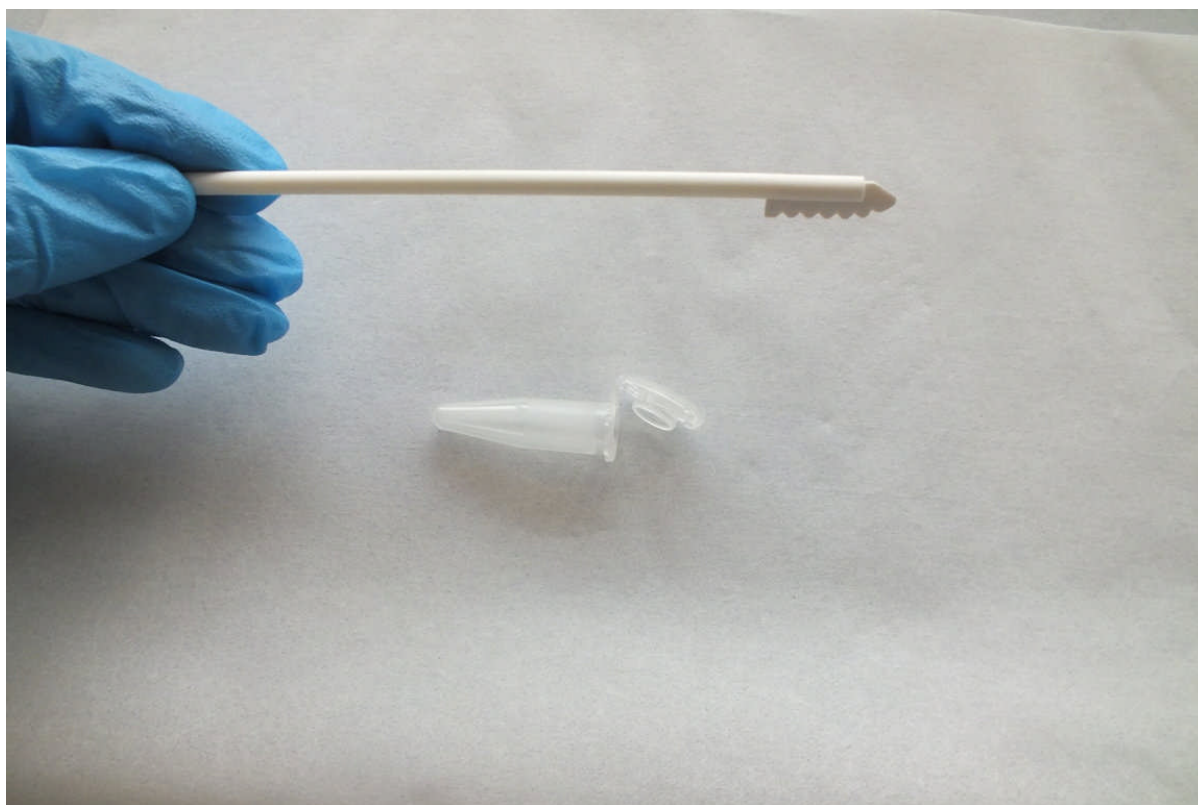
Групите ги сочинуваат испитаници на возраст над 18 години, од двата пола, кои не се роднини по мајчина линија. Испитаниците беа од различни региони од Република Македонија, слика 6.



Слика 6. Населени места на територијата на Република Македонија од каде што се земени примероци. Со сина боја се заокружени градовите од каде што се земени примероци од албанските испитаници. Со црвена боја се заокружени градовите од каде што се земени примероци од турските испитаници и со црна боја се заокружени местата од каде што се земени примероци од ромските испитаници.

2. Материјал

Како материјал за изолација на ДНК за изработка на популационата студија беше земен брис од усна слузница од сите испитаници [106]. Брисот беше земен со Omni Swabs Collectors, Whatman, Maidstone, UK, слика 7. Земањето на брис е безболно, трае помалку од 30 секунди, а се изведува со движење на четкичката од брисот нагоре и надолу неколку пати од внатрешната страна на образот на испитаникот. Откако ќе се земе примерокот, се става во пластична епрувета од 1,5 мл (епендорф) со отворено капаче за да се исуши. Штом се исуши, брисот е подготвен за процесирање. За форензичките случаи кои беа актуелни во текот на изработката на докторската студија за чие решавање беше неопходна анализа на митохондријална мтДНК, како материја за изолација на мтДНК беа земени крв и брис од усна слузница, а при идентификацијата на леш со напреднати трулежни промени беше земена коска.



Слика 7. Четка (swab collector) за земање примерок од усна слузница

3. Методи

Лабораторискиот процес на добивање и анализа на мтДНК се состои од следниве чекори:

- екстракција (изолација) на ДНК;
- амплификација со PCR-реакција;

- проверка на PCR-продуктите на агарозен гел;
- прочистување на амплификационите продукти;
- секвенционирање на мтДНК;
- прочистување на секвенционираниите продукти;
- капиларна електрофореза;
- софтверска анализа на резултатите од секвенционирање на мтДНК со следниве чекори:

1) анализа на резултатите од секвенционирање со DNA Sequencing Analysis Software v.5.4 и одредување на мутациите со софтвер SeqScape v.2.6 или со софтверот Sequencher v.5.1, при споредба со референтна секвенца [52];

2) одредување на хаплогрупи.

3.1. Изолација на мтДНК

Изолацијата на ДНК претставува одвојување на протеините од молекулата на ДНК и на другите клеточни составни делови со цел да се добие чиста молекула на ДНК која ќе може понатаму да биде анализирана. Постојат различни методи за изолација на ДНК, а изборот на методата зависи од примерокот од кој треба да се издвои ДНК, од можностите со кои располага лабораторијата, времето потребно за изработка на протоколот и ризиците од контаминација. Изолацијата на митохондријалната ДНК се изведува на истиот начин како и изолацијата на јадрената ДНК. Во изолатот на крајот од постапката, освен јадрена ДНК се добива и митохондријална ДНК. Која од нив понатаму ќе се анализира се одредува со реакцијата на амплификација, односно со употребата на специфични прајмери за амплификација на деловите кои ни се од интерес од јадрената или митохондријалната ДНК.

За изолација на мтДНК беа применети четири техники кои се користат во форензичките лаборатории, а тоа се: органска изолација, изолација со методата со Chelex, изолација со Qiagen-кит и изолација со PrepFiler.

Органската изолација, која уште се нарекува Phenol-chloroform изолација, е една од првите методи за изолација на ДНК, со незаменлива улога кога методите за обработка на ДНК бараат интактна ДНК со висока молекуларна тежина, како што е методата на фрагментни должински полиморфизми добиени со рестрикциони ензими (англ. *Restriction Fragment Length Polymorphism-RFLP*), која била широко користена пред воведувањето на PCR- методите. Органската екстракција на ДНК-молекулите се користи и денес кога се обработува биолошки материјал кој е од постар датум и започнале трулежни промени. Честопати се користи при изолација на ДНК од коски, заби или влакна [107] [108].

Изолацијата со **Chelex**, BioRad [109] е многу побрза од органската изолација, поедноставна е за изведување, се избегнува употреба на токсични хемикалии како што е Phenol-от и Chlorophorm-от, а поради малиот број на чекори во постапката, можноста за контаминација е помала. Во оваа метода се употребува суспензија од хелатна смола која се додава на примерокот. Смолата се врзува за поливалентни катјони како што е магнезиумот и на тој начин се оневозможува дејството на нуклеазите кои за својата функција бараат присуство на магнезиумови јони. На тој начин ослободената ДНК е заштитена од разградување. Во нашата лабораторија за изолација на ДНК користиме Chelex 100 од Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA. Смолата се раствора во дејонизирана вода (dd H₂O) како 5% суспензија, а постапката на работа е по одреден протокол [110]. Со оваа метода се добива едно верижна ДНК која понатаму може да се процесира со PCR-реакција.

Изолацијата со **PrepFiler**, Forensic DNA extraction kit, Life Technologies, користи технологија на магнети партикли со оптимизирана повеќекомпонентна хемија, со што се овозможува добивање на високо прочистена ДНК без инхибитори. Оваа метода се користи за изолација на ДНК од форензички примероци каде што количеството на клетки е многу мало, како и од заби и коски, при што се користи 50 мг од коскената прашина.

Изолацијата со **QIAmp DNA micro kit** (Qiagen, Valencia) е исто така едноставна за изведување, користи технологија за прочистување на ДНК и мтДНК од примероци со мала количина. Постапката на изолација со Qiagen се состои од четири чекори: лизирање, врзување на ДНК во лизатот за мембраната на QIAmp MinElute-колони, испирање на контаминатот и елуирање на ДНК од мембраната. Во зависност од тоа каков е примерокот, се користат различни протоколи за работа дадени во прирачникот на китот. Постапката е погодна за широк опсег на примероци, едноставна е за изведување и дава добри резултати.

Со методата на Qiagen беше изолирана ДНК од испитаниците за популационата студија и крвта од испитаниците во форензичките случаи.

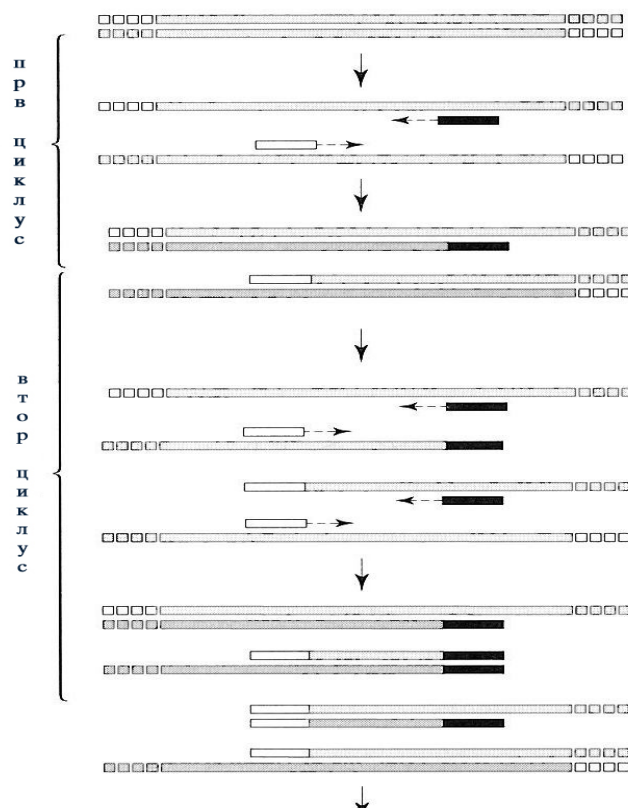
Во текот на изработката на докторската студија, со анализа на мтДНК беа решени два форензички случаја, едниот за одредување на крвно сродство брат-сестра, а другиот за идентификација на леш кој беше со напреднати трулежни промени, делумно скелетизиран. Од братот и сестрата како материјал за изолација на ДНК беа земени крв и брис од усна слузница. Од случајот за идентификација од референтен примерок, односно примерок за споредба, во конкретниот случај ќерката на покојната, беше земена крв, додека од телото на лешот кој делумно беше скелетизиран, а дел од меките ткива кои беа останати беа сапонифицирани, беше земена коска за ДНК-анализа. Коската беше изолирана со методата на PrepFiler. Обработката на коската е подолг процес кој опфаќа чистење на коската пред изолација најпрво од нечистотиите на површината на коската. Чистењето на површината е со помош на четка со вода, а може и

површински да се иструга со шмиргла или дремел. Потоа, парчето коска приближно 6-7 грама се завиткува во алуминиумска фолија и со чекан се крши на повеќе помали парчиња. Потоа следува миење на парчињата коска по следниов редослед: со 2% SDS (Sodium dodecil sylphat) во чаша со магнетна мешалка во траење од 10 минути, потоа трикратно промивање со ddH₂O во траење од 5 минути за секое промивање, две промивања со NaClO (10% Natrium hypochloride) во траење од 10 минути, трикратно промивање во ddH₂O во траење од 10 минути и трикратно промивање со 100% етанол во траење од 10 минути. Со ваквото промивање на коската се отстрануваат нечистотиите кои би можеле да се однесуваат како инхибитори понатаму во реакцијата, а со промивањето со 100% алкохол се врши обезмастување на коската. Откако ќе се измие коската на опишаниот начин, се остава да се исуши преку ноќ. Наредниот ден се троши до прав во апарат за мелење Mixer Mill MM 301, Retsch, Germany. На апаратот се ставаат метални цилиндри во двата или во еден од нив се става парчето коска, по што цилиндарот се потопува во течен азот (-196 °C). Со потопувањето во течен азот се олеснува кршењето на коската, таа станува покрута и се спречува загревањето на коската поради движењето со висока фреквенција на цилиндрите во кои се ставаат парчињата коска, бидејќи со загревањето на коскената прав може да се компромитира добиената ДНК. Коскената прав се користи за изолација на ДНК.

3.2. Амплификација на мДНК со PCR-реакција

Кратко време од откривањето од страна на Kary Mullis, PCR-реакцијата стана револуционерно откритие за молекуларната биологија. Во PCR-реакцијата настанува копирање на ДНК-молекулата во тест-тубичка со користење на основните елементи на природниот процес на умножување на ДНК. Во едноставен пуферски систем, одреден регион од примерокот на ДНК-молекулата се копира со ензим ДНК-полимераза која ги користи дезоксинуклеотидите како градежни блокови на новите нишки. Олигонуклеотидни прајмери кои се специфични за дел од секвенцата на ДНК-молекулата се врзуваат за примерокот на ДНК според правилото на спарување на базите и со тоа го дефинираат регионот кој ќе биде ископиран [111]. Копирањето настанува на тој начин што двете вериги на примерокот на ДНК се раздвојуваат со топлина која овозможува раскинување на водородните врски со кои се поврзани базните парови помеѓу себе, процес познат како денатурација, потоа олигонуклеотидните прајмери ја наоѓаат својата комплементарна секвенца на примерокот (*англ. template*) на ДНК и ДНК-полимеразата почнува да додава дезоксинуклеотиди на 3'-ОН крајот од прајмерите, создавајќи нови двоверижни молекули. Во следниот чекор на PCR-реакција при загревање, овие нови двоверижни молекули уште еднаш се денатурираат и секоја единечна нишка (и оригиналниот примерок и новосинтетизираните нишки) обезбедува места за врзување на прајмерите и

претставува темплејт за понатамошна ДНК-синтеза. И така со секој нареден PCR-циклус настанува истиот процес на денатурација на нишките на ДНК-молекулите, врзување на прајмери и нивна елонгација со додавања на дезоксинукелотиди и формирање на нови двоверижни ДНК-молекули. На овој начин доаѓа до експоненцијално зголемување на бројот на копии на таргет-секвенцата од ДНК-молекулата, односно по 20 PCR-циклуси ќе настанат 10^6 нови нишки. Процесот не е 100% ефикасен и обично е потребно поголем број на PCR-циклуси, најчесто помеѓу 25-40 во зависност од концентрацијата на почетниот ДНК-материјал и од понатамошната апликација. PCR-реакцијата се одвива со употреба на различни температури, во три чекори на реакцијата, кои доведуваат до денатурација (англ.. denaturation), врзување (англ.. annealing) и екстензија (англ..extension) (слика 3).



Слика 8. Со PCR-процесот теоретски се дуплира количеството на целната ДНК при секој циклус. Во вториот циклус веќе е дефинирана должината на едносинцирните вериги со врзувањето на прајмерите во првиот циклус.

Од изолираната ДНК, од испитаниците во популациската студија беше амплифициран целиот контролен регион. Амплификацијата на целиот контролен регион кој е со должина од 1122 базни пара од позиција 16024 до позиција 576, во единечна PCR-реакција, го поедноставува процесот и го намалува ризикот од мешање на примероците во фаза на PCR-продукти. Во табела 4 е дадена секвенцата на прајмерите кои беа користени за амплификација на целиот контролен регион.

Табела 4. Секвенца на прајмери за амплификација на контролниот регион на мтДНК

F 15851	5' ATC TCC CTA ATT GAA AAC AAA ATA CTC AAA 3'
R 639	5' GGG TGA TGT GAG CCC GTC TA 3'
F 15900	5' TAA ACT AAT ACA CCA GTC TTG TAA ACC 3'
R 599	5' TTG AGG AGG TAA GCT ACA TA 3'

Реакцијата на PCR се изведуваше со мешање на различни компоненти и потоа додавање на дејонизирана вода поради постигнување на одреден волумен и концентрација на компонентите. Компонентите кои беа користени за амплификација на контролниот регион во PCR-реакција со волумен од 25 µl се следни: 2.5 µl GeneAmp 10x PCR Gold Buffer (1x15 mM Tris-HCl, pH=8.0, 50 mM KCl) (Applied Biosystems), 2 µl 2.5 mM dNTP микс, Life Technologies, 2,5 µl 2,5 mg/ml BSA (Bovine serum albumine, Sigma Aldrich), 0,5 µl 10mM прајмери за амплификација и 0,2 µl на Advantage Polymerase, Takara, Clontech.

Протоколот за PCR-реакцијата, која се одвиваше во PCR-апарат, GeneAmp PCR system 9700, Applied Biosystems, за амплификација на контролниот регион на мтДНК е следен: 95°C-2 минути, следено од 35 циклуси со 95°C-15 секунди, 56°C-30 секунди и 72°C-90 секунди и еден циклус 72°C- 10 минути.

Изолираната ДНК од форензички случаи кај кои беше потребно да се направи мтДНК-анализа беше амплифицирана за хиперваријабилните региони по должина на контролниот регион на мтДНК, и тоа хиперваријабилен регион еден HV1 и хиперваријабилен регион два HV2 каде што се наоѓаат најголем број од полиморфизмите на мтДНК.

Хиперваријабилните региони на мтДНК, HV1 и HV2 беа амплифицирани со полимеразноверижната реакција (PCR) во термоблок- GeneAmp PCR system 9700, Applied Biosystems. Прајмери (англ. *primer*) кои беа користени за амплификација на двата хиперваријабилни региона се дадени во табела 5.

Табела 5. Прајмери за амплификација на HV1 и HV2-регионите

F15971	5' TTAACCTCCACCATTAGCACC 3'
R16410	5' GAGGATGGTGGTCAAGGGAC 3'
F29	5' GGTCTATCACCCSTATTAACCAC 3'
R408	5' CTGTAAAAGTGCATACCGCCA 3'

PCR-реакцијата беше спроведена во 25 µl волумен реакција, со следниве компоненти: 2.5 µl GeneAmp 10x PCR Gold Buffer (1x15 mM Tris-HCl, pH=8.0, 50 mM KCl) (Applied Biosystems), 1.5 µl 25 mM MgCl₂, Applied Biosystems, 2 µl 2.5 mM dNTP

микс, Applied Biosystems, 2 μ l 5mM 5'-3' прајмер за амплификација и 2 μ l 5 μ M 3'-5' прајмер за амплификација и 0,25 μ l на AmpliTaq Gold ДНК полимераза (Applied Biosystems) [112].

Условите за PCR-реакција беа следниве: 94°C-11 минути, следено од 32 циклуса: 94°C-20 секунди, 56°C-10 секунди и 72°C-30 секунди. Продуктите можат да се чуваат на 4 °C до нивно прочистување пред секвенционирање.

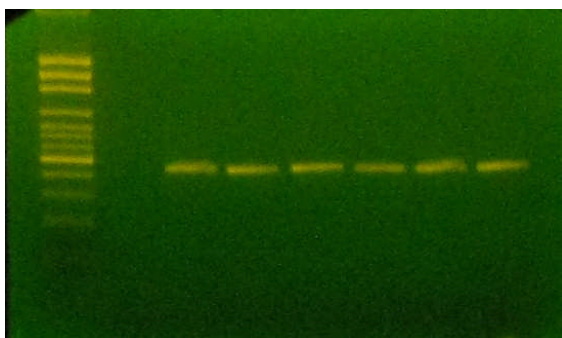
3.2.1. Проверка на PCR-продуктите на агарозен гел

По завршување на амплификацијата, за проверка на PCR-продуктите се користи 2% агарозен гел, кој се подготвува од агароза, Agarose for the separation of GeneAmp PCR products, Applied Biosystems во TBE (Tris, H₃BO₃ и EDTA) или TAE-пуфер, Sigma Aldrich. Откако ќе се раствори агарозата во пуферот со помош на загревање до вриење на течноста, се додава етидиум бромид, Applied Biosystems. Етидиум бромидот е боја која се користи за детекција на ДНК во гел со инсертирање помеѓу базните парови во двоверижниот хеликс на ДНК. Има UV-апсорбирачка моќ максимум на 300 и 360 nm, а емисија максимум на 590 nm.

PCR-продуктите измешани со боја Orange-G, Sigma Aldrich, во сооднос 5 μ l PCR produkt + 3 μ l Orange-G се аплицираат во претходно направени бунарчиња во гелот. Во едно од бунарчињата се става PCR-маркер (100 bp ladder, Serva Electrophoresis, GmbH, Heidelberg), кој содржи фрагменти со различна, позната големина, со кои се споредува PCR-продуктот од примероците. На овој начин знаејќи ја големината на PCR-продуктот кој треба да го добиеме, може да видиме дали имаме специфична амплификација.

Знаејќи ги местата каде што се врзуваат прајмерите по должината на мтДНК (описани во табела 5), очекуваната големина на PCR-продуктите за HV1-регионот би била 404 базни пара (bp), а големината на PCR-продуктот за HV2-регионот би била 379 базни пара. Освен за проверка на специфична амплификација, од интензитетот на бендот го одредуваме количеството на PCR-продуктот кој понатаму ќе го користиме во реакцијата на секвенционирање (слика 9).

L neg. poz. 1 2 3 4 5



Слика 9. Електрофореза на агарозен гел за проверка на PCR-продуктите. L=allelic ladder 100 bp, neg. е негативна контрола, поз. е позитивна контрола, 1-5 се примероци

3.3. Прочистување на амплификационите производи

PCR-продуктите добиени со амплификација на ДНК пред процесот на секвенционирање се прочистуваат. Прочистувањето може да се врши на различни начини со цел отстранување на заостанати вишок реагенси кои биле користени за PCR во примерокот како што се прајмери, нуклеотиди, компоненти на пуферот, како и неспецифични амплификациони продукти.

3.3.1. Вишок прајмери и dNTP-a

По PCR-амплификацијата се создаваат PCR-продукти кои се присутни во растворот заедно со PCR-прајмери, dNTP, ензими и компоненти од пуферот. Вишокот на PCR-прајмери кои остануваат по PCR-амплификацијата се однесуваат компетитивно со прајмерите за секвенционирање за местата на врзување и за компонентите во реакцијата. Овие преостанати PCR-прајмери претставуваат главна тешкотија во хемизмот на флуоресцентните терминатори (дидезокси dNTP-a или ddNTP-a), кои се вградуваат во процесот на екстензија по врзувањето на прајмерите за темплејтот. Доколку останат PCR-прајмери се добиваат дополнителни сигнали и лоши резултати. Вишокот на dNTP-a од реакцијата на амплификација може да ја наруши рамнотежата на реакцијата на секвенционирање што доведува до намалено терминирање на пократките екстензиони продукти.

3.3.2. Неспецифични производи на PCR

Во неспецифични производи на PCR спаѓаат димери на прајмерите и неспецифични PCR-продукти. Доколку се присутни во поголемо количество, може да се причина за лош квалитет на податоците од секвенционирањето. Неспецифичните PCR-продукти се однесуваат како темплејти во реакцијата на секвенционирање и даваат производи на екстензија што доведува до настанување на "шума" од нејасни податоци. Неспецифичните PCR-продукти можат да се видат и на агарозен гел. Доколку постојат треба повторно и подобро да биде оптимизирана PCR-реакцијата.

Постојат неколку начини за прочистување на PCR-продуктите. Методи кои беа користени за прочистување на PCR-продуктите при изработката на анализите за докторската студија се следниве:

-прочистување со ензим ExoSAP-IT, Amersham, Affymetrix, кој е комбинација од алкална фосфатаза од рак SAP (англ. *Shrimp alkaline phosphatase*) и егзонуклеаза I (*Exo T*). Процедурата SAP/Exo ги деградира нуклеотидите и едновржната ДНК (прајмери) кои преостанале по PCR- реакцијата [113]. Постапката се одвива на следниов начин: 25 μ l PCR продукт + 10 μ l Exo-SAP-IT, во термостат на 37°C-15 минути, 80°C-15 минути и потоа до секвенционирање на 4°C.

На овој начин беа прочистени PCR-продуктите по амплификација на контролниот регион кај примероците кои беа вклучени во популационата студија. Изборот на методата беше поврзан со можноста едновремено да бидат прочистени поголем број на примероци.

-прочистување со MinElute PCR Purification kit, Qiagen е ефикасна метода за прочистување на PCR-продукти со големина од 70 bp до 4 kb. Постапката се состои во прочистување на ДНК (PCR) фрагменти од заостанати ензими, соли и олигонуклеотиди на тој начин што ДНК (PCR-продуктот) во текот на постапката се врзува за силиконска мембрана, додека контаминантите минуваат низ колонката. Нечистотиите се одмиваат со плакнење со пуфер, а чистата ДНК на крајот од постапката се раствора со Tris пуфер или вода. Во текот на постапката, вишокот на прајмери, соли, ензими и неврадени олигонуклеотиди кои не се врзуваат за силиконската мембрана, ќе поминат низ колонката. Солите се измиваат со пуферот PE кој содржи етанол, а остатокот од пуферот, кој може да влијае на понатамошната ензимска реакција, се отстранува со дополнително центрифугирање.

Со методата на MinElute PCR Purification kit беа прочистени PCR-продуктите по амплификација на двата хиперваријабилни региона кај испитаниците од форензичките случаи.

Постапката е следна: се обележуваат две епендорфчиња со ист број на примерок. Во едното се подготвува реакцијата, а во другото на крај се ставаат колонките. Во епендорфчето каде што се подготвува реакцијата се става 100 μ l PE-пуфер и 20 μ l PCR-продукт, се мешаат а потоа вкупното количество од 120 μ l се става во колонка (од китот). Се центрифугира на 13000 rpm 1 минута, течноста под колонката се истура и пак се враќа тубичката под колонката. Потоа се додава 700 μ l PE пуфер врз колонката и се центрифугира на 13000 rpm -1 мин. Повторно се истура течноста под колонката, се враќа тубичката и се центрифугира на 13000 rpm -1 мин. По ова центрифугирање, колонките се ставаат во чисто (претходно обележаното) епендорфче и во неа се додава 25 μ l ddH₂O. Стои 1 минута на собна температура, а потоа се центрифугира на 13000 rpm -1 мин. Тоа што ќе се добие во епендорфчето е прочистена ДНК, односно прочистен PCR-продукт, спремен за секвенционирање.

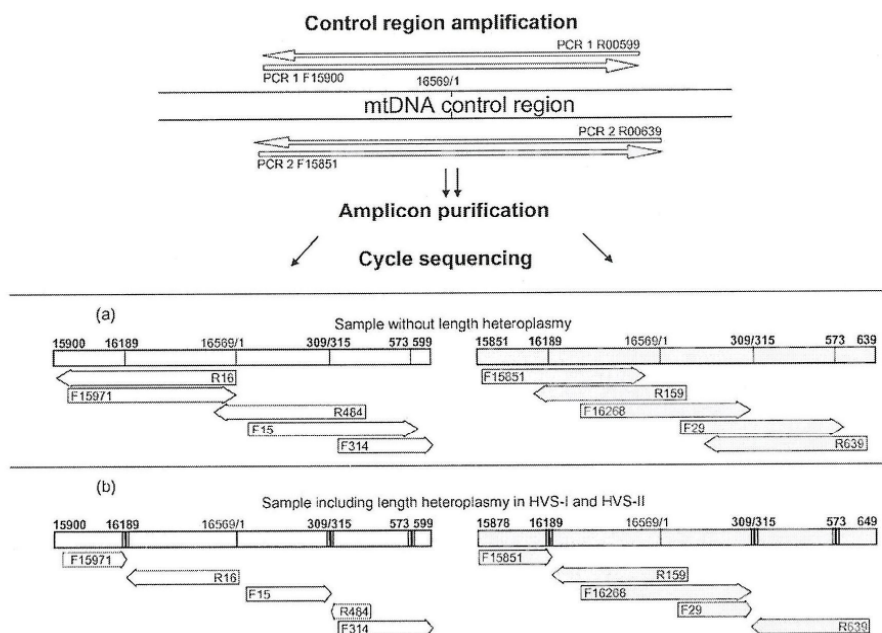
Со процесот на прочистување на PCR-продуктите, концентрацијата на продуктот може да биде зголемена. Главен недостаток на прочистувањето е губење на продуктот, бидејќи ниту една процедура на прочистување не ја дава 100% количината.

3.4. Секвенционирање на мДНК

Секвенционирањето на ДНК со методата на дидезокситерминатори првпат било опишано во 1977 година од Sanger и соработниците [50]. Процесот на секвенционирање е сличен со PCR-процесот, но би можел да се опише како асиметричен PCR. Во процесот на секвенционирање, ДНК-полимеразата врши копирање на едносинцирната ДНК со додавање на нуклеотиди, почнувајќи од 3' крајот на прајмерот, а во правец 5'-3' на веригата на ДНК. Освен нуклеотиди, во реакцијата се наоѓаат и дидезоксинуклеотиди на кои им недостасува хидроксилна група во 3' положба. Со нивното вградување се прекинува понатамошната синтеза на синцирот селективно на А, С, Т или G-базата. Цикличното секвенционирање е метода во која последователните чекори се денатурација, врзување и екстензија во Термо сајклер (англ. *Thermal Cycler*) што доведува до линеарна амплификација на производи на екстензија. Потребните реагенси за циклично секвенционирање се содржани во китот BigDye Terminator (Applied Biosystems), каде што дидезоксинуклеотидите се обележани со различна флуоресцентна боја.

За секвенционирање на амплифицираните продукти беше користен кит за секвенционирање, BigDye terminator v1.1, Applied Biosystems, кој содржи полимераза, дезоксинуклеотиди и флуоресцентно обележани дидезоксинуклеотиди. Реакцијата на секвенционирање ги содржи следниве реагенси: 4 μ l BigDye terminator v.1.1 + 2 μ l 5x пуфер за секвенционирање, PCR-продукт од 1-10 μ l, 2 μ l "forward" прајмер или 2 μ l "reverse" прајмер и до 20 μ l волуменот се дополнува со ddH₂O. Количеството на PCR-продуктот во реакцијата на секвенционирање е различна и зависи од успешноста на амплификацијата на примерокот во PCR-реакцијата, а може да се заклучи од јачината на бендот од примерокот на агарозниот гел.

По амплификација на целиот контролен регион од 1122 базни пара, PCR-продуктот беше секвенциониран со внатрешни прајмери прикажани во табела 6. Најмалку 10 внатрешни прајмери се потребни за да се задоволат минималните потреби за две независни "forward" и "reverse" секвенсни нишки да ја покријат секоја позиција на контролниот регион. Двојното читање со два прајмера, прајмер од напред кон назад (forward) и од назад кон напред (reverse) на секвенцата е неопходно за да се избегнат таканаречените фантом мутации [114]. Исто така, докажано е дека е корисно да се изведе реакција на секвенционирање на два независни PCR-продукта амплифицирани со различни парови на прајмери со цел да се увидат потенцијални PCR-артефакти и да се избегне отсуство на амплификација во случаи каде што на местото на врзување на прајмерот има мутација. Прајмерите за секвенционирање треба да се така избрани што со двата ампликона да се добијат комплементарни информации за секвенцата, како што е прикажано на слика 10 [115].



Слика 10. Шематски приказ на амплификација и секвенционирање со целосно покривање на целиот контролен регион

Табела 6. Секвенци на прајмери користени за секвенционирање на целиот контролен регион на мтДНК

F 15851	5' ATC TCC CTA ATT GAA AAC AAA ATA CTC AAA 3'
F 15971	5' TTA ACT CCA CCA TTA GCA CC 3'
F 16268	5' CAC TAG GAT ACC AAC AAA CC 3'
F 15	5' CAC CCT ATT AAC CAC TCA CG 3'
R 484	5' TGA GAT TAG TAG TAT GGG AG 3'
F 314	5' CCG CTT CTG GCC ACA GCA CT 3'
R16	5' TGA TAG ACC TGT GAT CCA TCG TGA 3'
R 159	5' AAA TAA TAG GAT GAG GCA GGA ATC 3'
F 29	5' CTC ACG GGA GCT CTC CAT GC 3'
R 639	5' GGG TGA TGT GAG CCC GTC TA 3'

Условите за секвенционирање на контролниот регион кое се одвиваше во термосајклер 9700, Applied Biosystems, се следниве: 96°C-1 минута, следено со 25 циклуси: 96°C-10 секунди, 50°C-5 секунди и 60°C-4 минути, а потоа до прочистување на продуктите, примероците остануваат на 4 °C.

Прајмери кои беа користени за секвенционирање на HV1 и HV2-хиперваријабилните региони од контролниот регион се истите како и за амплификација, прикажани во табела 4.

Условите за секвенционирање на HV1 и HV2-регионите, кое се одвиваше во термосајклер, 9700 Applied Biosystems, се следниве: 96°C-1 минута, следено со

25 циклуси: 96°C-10 секунди, 50°C-5 секунди и 60°C-4 минути, а потоа до прочистување на продуктите на 4 °C.

3.5. Прочистување на секвенционираниите производи

Вишокот на терминаторите од завршената реакција на секвенционирање мора да биде отстранет пред анализа на примерокот со електрофореза, бидејќи може да ги покрие податоците и да пречи во одредувањето на базите при електрофореза.

Постојат различни протоколи за прочистување на продуктите на секвенционирање. Ние ги користевме методите на прочистување со колонки Sephadex и колонки Centri-Sep Spin (Princeton Separations, Adelphia) кои се наполнети со сув гел. Прочистувањето се одвива по определен протокол на работа, кој опфаќа хидрирање на колонките со ddH₂O, отстранување на вишокот вода со центрифугирање, а потоа додавање на секвенционираниот продукт врз гелот и со центрифугирање продуктот минува низ гелот и излегува во прочистена форма.

По прочистувањето на продуктите со колонки Centri-Sep Spin, следува испарување на продуктите за добивање на сув талог. Испарувањето се одвиваше во вакуум-центрифуга, 5401 Concentrator plus, Eppendorf, на 30°C (слика 11), во траење 40-50 минути, времето варира, но центрифугирањето треба да трае сè до добивање на сув талог. По испарувањето, примероците може да се спремат за електрофореза. Доколку не се работи електрофореза веднаш по сушењето, тогаш примероците се ставаат во фрижидер на -20°C до продолжување на постапката.



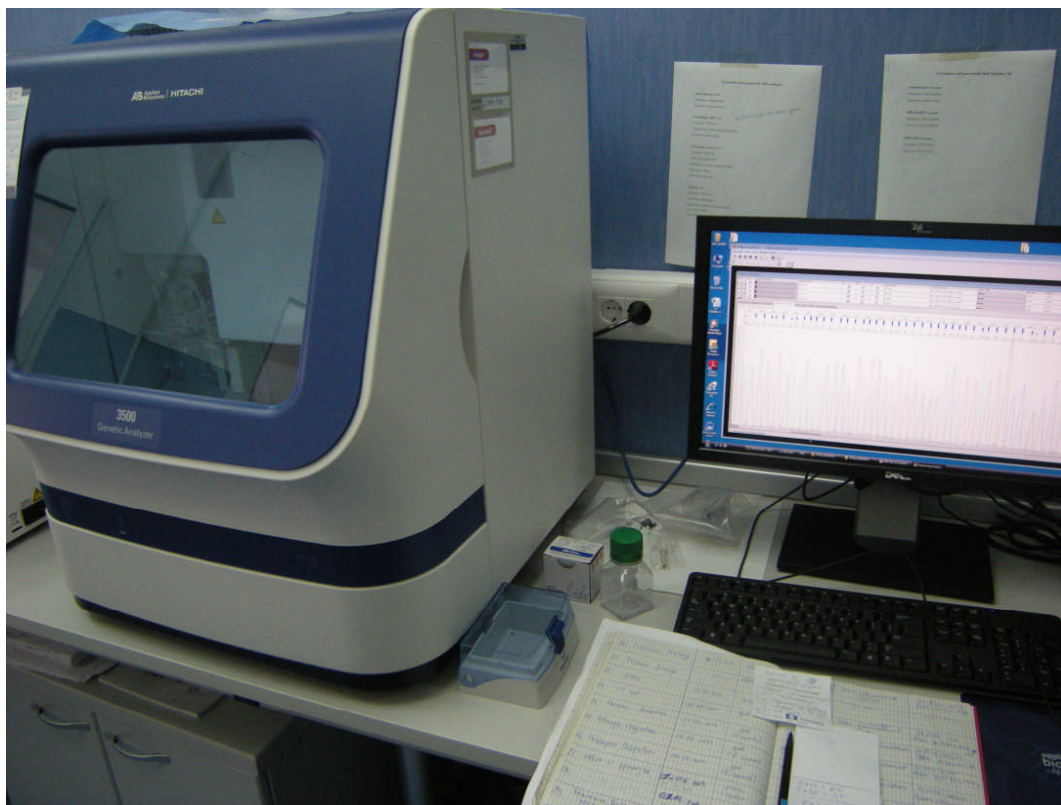
Слика 11. Прикажани се вакуум-центрифуга - Concentrator plus, Eppendorf, во која се врши испарување на прочистените реакции на секвенционирање до сув продукт и десно е прикажана центрифуга - Mikro 200R, Hettich.

3.6. Капиларна електирофореза

Капиларната електрофореза овозможува раздвојување на базите по секвенционирање и е интегрален дел на процесот за отчитување на секвенцата на мтДНК. Пред раздвојувањето на секвенците, примероците беа соодветно спремени за електрофореза. Односно, во секој примерок се додава по 12 μ l HiDi формамид, Applied Biosystems, се вортексира кратко тубичката, за да се раствори талогот од секвенционираниот продукт во формамидот, а потоа по 10 μ l од примероците со формамид се префрлаат во бунарчиња од плочки за електрофореза. Плочката за електрофореза, со вкупно 96 бунарчиња, се става на PCR-апарат и со подесување на температурата на 95 °C во траење од 3 минути, примероците се денатурираат. Потоа веднаш се ставаат на мраз во траење од 3 минути. Со оваа постапка се овозможува денатурација на секвенционираниите продукти на висока температура, а со ставање на мраз се спречува да дојде до нивно повторно поврзување во дуплекс. Ваквото раздвојување на нишките е неопходно за да може секвенцата по должина на нишката да биде прочитана при електрофорезата.

Раздвојувањето на секвенците со електрофореза беше изведено на 8-капиларен секвенатор, *ABI PRISM 3500 Genetic Analyzer* (слика 12) и на 24-капиларен секвенатор, *ABI PRISM 3500xL*. Раздвојувањето на фрагментите на

мтДНК се одвива во одреден матрикс, односно гел POP-7, Applied Biosystems, редоследно според големината на фрагментите. Електрофорезата се одвива во капиларна низа од 8 или 24 капилари, 3500 Capillary Array од 50 см. Претходно апаратот се загрева на 60°C.

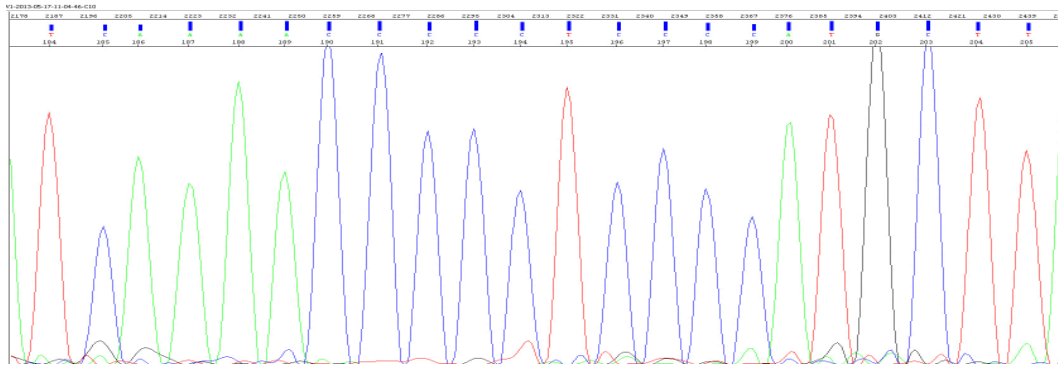


Слика 12. Прикажан е 8-капиларен секвенатор (3500 Genetic analyzer), на кој се врши раздвојување на секвенците со електрофореза

4. Софтверска анализа на резултатите од секвенционирање на мтДНК

4.1. *Анализа на резултатите од секвенционирање на мтДНК и одредување на мутации (полиморфизми)*

По завршување на електрофорезата, примероците (ранови) се сочувани како "сурови" податоци кои може да ги видиме со помош на софтверот *DNA sequencing analysis software* верзија 5.4, Applied Biosystems, кој е инсталиран на компјутер поврзан со апаратот за секвенционирање. Со помош на овој софтвер можат да се видат секвенцата на мтДНК, квалитетот на базите, односно успешноста на хемиската реакција и квалитетот на електрофорезата. Во овој софтвер може да се направи едитирање на базите. На слика 13 е даден приказ на дел од секвенцата како "сурови" податоци.



Слика 13. Приказ на дел од секвенцата на мтДНК со DNA sequencing software v 5.4. Над секоја база се гледаат сини столбови кои укажуваат на добар квалитет на секвенционираниите нуклеотиди

Откако сме ги виделе и анализираме ”суровите” ранови, добиената секвенца може да се прочита со друг софтвер, исто така инсталиран на компјутер поврзан со секвенаторот, *SeqScape software* - верзија 2.6. Откако рановите ќе се импортираат во *SeqScape software* - верзија 2.6. (Applied Biosystems, Foster City), софтверот прави споредба на секвенцата на испитуваниот примерок со референтната rCRS-секвенца [52] и се регистрираат разликите, односно полиморфизмите кои ќе се најдат кај испитуваниот примерок. Софтверот сам ги покажува местата каде што постојат разлики, но ние ги проверуваме и ги внесуваме во софтверот како нуклеотидни варијанти притоа назначувајќи дали новата варијанта, односно полиморфизам е точкеста мутација (транзиција или трансверзија) или е делеција или инсерција, слика 14. На крај, резултатите се прикажуваат во извештај за мутации - Mutation Report како разлики со референтната rCRS-секвенца.



Слика 14. Приказ на анализа на секвенците во SeqScape-софтверот. Двете нишки, добиени со секвенционирање со Forward и Reverse-прајмерите, се подредени една под друга и се споредени со референтната секвенца.

Доколку се тестираат форензички примероци, освен споредбата со референтната секвенца, се прави и споредба на секвенцата на примероците помеѓу себе, имајќи предвид дека сите крвни сродници по мајка ќе имаат иста секвенца на мтДНК.

Анализата на секвенците и одредувањето на присутните полиморфизми кај испитаниците од популационата група беше направено со примена на софтвер Sequencher v5.1, Gene Codes Corporation, кој исто така врши споредба на секвенците со референтна секвенца означувајќи ги местата каде што постојат разлики за да бидат воочени и проверени од експертот кој ја врши анализата на секвенците. На крај, сумарно се прикажуваат сите полиморфизми во контролниот регион во споредба со референтната Андерсонова секвенца.

4.2. Статистичка анализа на резултатите

Статистичката анализа на форензичките случаи значи добиениот резултат од анализата на ДНК (ДНК профил) да се прикаже преку математика на докази (Forensic mathematics) [116] како LR (Likelihood ratio) или како PP (Posterior probability), кое за форензички случаи треба да е еднакво или поголемо од 99,9% за да се прифати доказот како потврден [117]. Во форензичката математика, освен LR, што претставува сооднос на две веројатности од ист настан под различни хипотези, постои и претходна претпоставка (prior probability), што претставува сигурност во предложениот доказ пред ДНК-анализата и крајна претпоставка (posterior probability), што претставува конечна сигурност во предложеното, по добивање на ДНК-резултатот.

Кај двата форензички случаја беа анализирани автозомни STR-и, а резултатите беа статистички анализирани со DNAVIEW-програмата [118]. Заради недоволен процент на статистичка веројатност, и во двата случаја беше потребно да се направи анализа на мтДНК, да се додаде во статистичката пресметка и да се одреди кумулативно PP (сPP).

Во статистичката обработка на резултатите за мтДНК се користи EMPOP (Forensic mtDNA database-EMPOP) базата на податоци од интернет [119]. Тука се внесува добиениот мтДНК-профил и се пребарува во соодветна популациска група, односно се пребарува македонска популација и софтверски се проверува веројатноста за случајно совпаѓање. Врз основа на добиената фреквенција се пресметува веројатноста LR за мтДНК со следнава формула:

$$LR=1/\text{frekvencija}$$

Потоа се пресметува комбинирана веројатност cLR, односно се мултиплицира LR од STR-ите и LR од мтДНК, преку следнава формула:

$$LR_c = LR(\text{STR}) \times LR(\text{mtDNA}),$$

а потоа се пресметува комбинацирано сPP (posterior probability), по следнава формула:

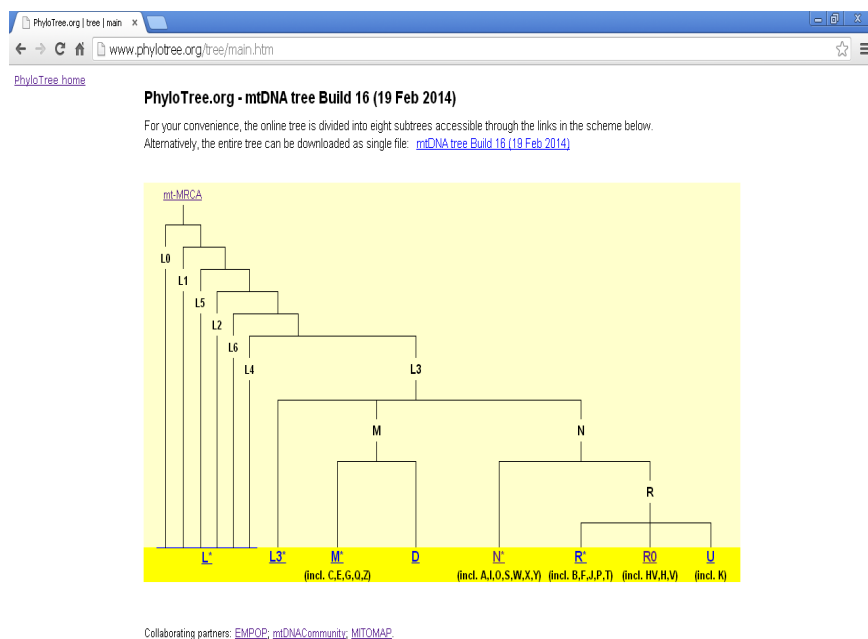
$$PP_c = LR_c \times \text{prior} / LR_c \times \text{prior} + (1 - \text{prior}) \times 100\%.$$

Со оваа формула се добива крајниот резултат, PP_c, односно крајната веројатност на совпаѓање.

Статистичката анализа на трите популациони групи од Република Македонија беше изработена со софтверскиот пакет за популациона генетска анализа Arlequin v 3.1 [120]. Беа направени анализи за секоја популациона група со одредување на фреквенцијата на хаплотиповите и молекуларниот диверзитет за контролниот регион од мтДНК, AMOVA (анализа на молекуларна варијанса за одредување на генетската структура на популацијата) за секоја популација и помеѓу различни популации [121]. Исто така, од анализите помеѓу популации беше одредена и F_{st}-споредба врз основа на генетската разлика за кратко време на дивергенција на популациите [122,123].

4.3. Одредување на хајлоџруји

Кај сите испитаници по добивањето на секвенцата на мтДНК (хаплотип) беше одредена хаплогрупата со помош на софтвер ЕММА [124] и рачно со користење на Phylotree 16 [125, 126], на веб-страницата <http://www.phylotree.org>. На слика 15 е прикажана во едноставна форма мтДНК-филогенезата со употреба на букви од азбуката.

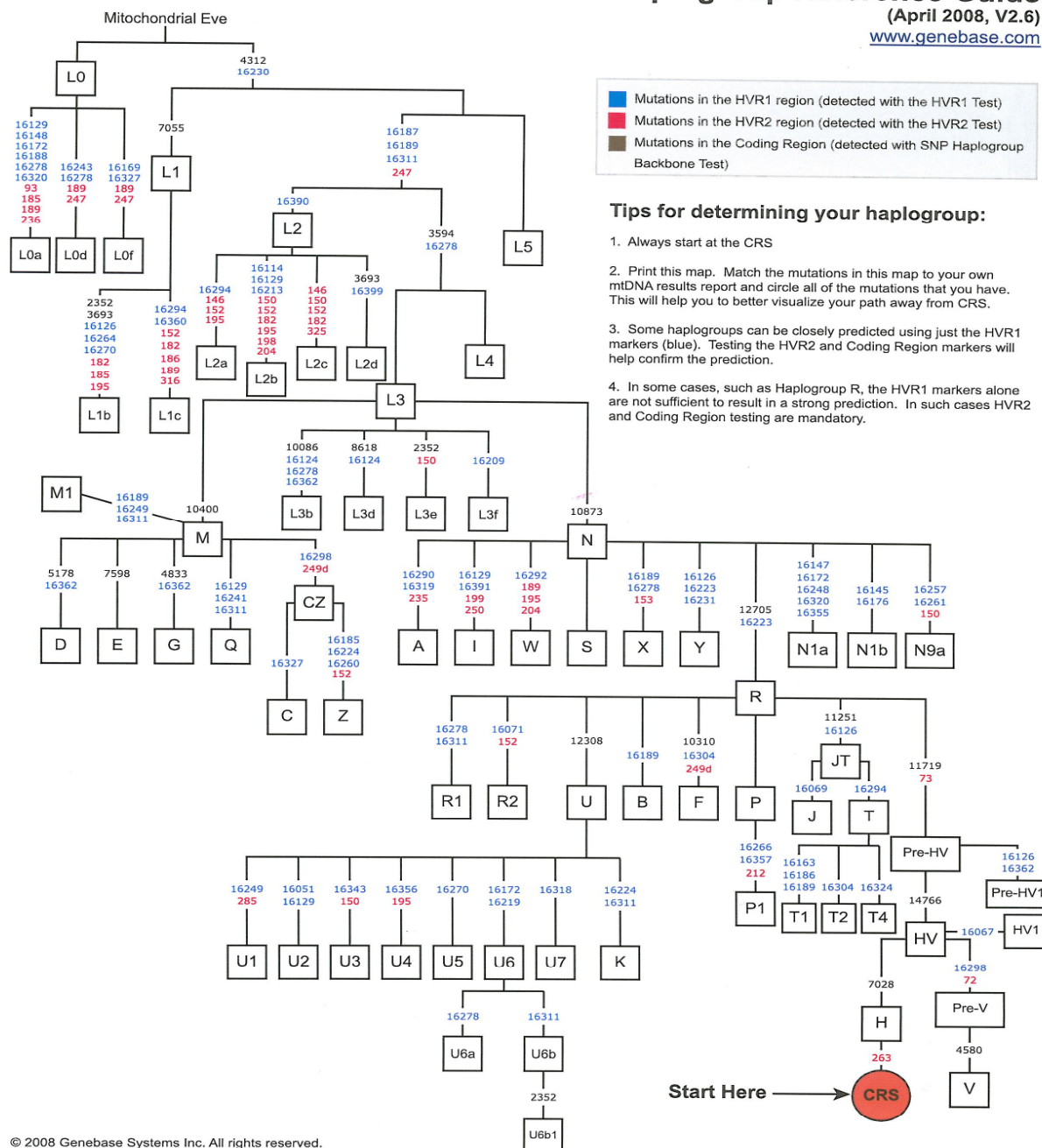


Слика 15. Генетското стебло на мтДНК Phylotree 16 од 19 февруари 2014 година. За означување на хаплогрупите употребени се букви освен буквата “O”. L-хаплогрупата е најстара линија и е карактеристична за Африка, упатувајќи на потеклото на модерниот човек од Африка. Од хаплогрупата L3 настанале хаплогрупите M и N, а од N настанала R-хаплогрупата која ги опфаќа сите варијанти што се сретнуваат надвор од Африка.

На сите испитаници од трите етнички групи кои живеат во Република Македонија им беше одредена хаплогрупата. Одредувањето беше со помош на референтен водич за мтДНК-хаплогрупи, прикажан на слика 16.

Genebase mtDNA Haplogroup Reference Guide (April 2008, V2.6)

www.genebase.com



© 2008 Genebase Systems Inc. All rights reserved.

Слика 16. Приказ на шема која се користи како водич при одредување на хаплогрупи во зависност од присутната мутација, односно полиморфизам во хаплотипната секвенца

V. Резултати и дискусија

1. мтДНК-податоци за испитаниците од три популациони групи во Република Македонија

Од есенцијална важност, а воедно и обврска на секоја лабораторија во која се врши секвенционирање на мтДНК во форензички цели е изработка на популациона студија, односно референтна база на податоци. Големината на популациониот примерок за етничките групи во Република Македонија, во кој се вклучени Албанците, Турците и Ромите, е 444 испитаници. Резултатите од секвенционирањето на контролниот регион (позиција од 16024 до позиција 576) на мтДНК кај овие испитаници од трите популациони групи (148 Албанци, 150 Турци и 146 Роми) од Република Македонија се прикажани во табелите бр. 7, 8 и 9. Добиените секвенци на мтДНК (хаплогрупи) врз основа на заеднички мутации се класифицирани во хаплогрупи.

Табела 7. Секвенца на целиот контролен регион кај албански испитаници, со прикажани разлики во споредба со rCRS. Одредени се и хаплогрупите кај секој испитаник.

#	ХАПЛОГРУПА		ХАПЛОТИП
A001	K1a10	1	16048A 16093C 16224C 16311C 16519C 73G 195C 263G 315.1C 497T 524.1A 524.2C 524.3A 524.4C
A002	H1e1b	1	16519C 263G 309.1C 315.1C 453C
A003	T1a5	1	16126C 16129A 16163G 16186T 16189C 16192T 16294T 73G 263G 309.1C 315.1C
A004	U3	1	16261T 16343G 73G 150T 263G 315.1C 524.1A 524.2C
A005	J1c+16261	1	16069T 16126C 16261T 73G 263G 295T 309.1C 315.1C 462T 489C
A006	T2b	1	16126C 16243C 16294T 16296T 16304C 16519C 73G 204C 207A 263G 315.1C
A007	I1a	1	16129A 16172C 16223T 16311C 16391A 16519C 73G 199C 204C 250C 263G 315.1C 455.1T 573.1C 573.2C 573.3C
A008	H	1	16256T 263G 309.1C 315.1C
A009	U4c1	1	16051G 16179T 16356C 16362C 16519C 73G 195C 263G 315.1C 499A 524.1A 524.2C
A010	H11a7	1	16311C 93G 152C 195C 198T 263G 315.1C
A011	H11a	1	16167T 16293G 16311C 195C 263G 309.1C 309.2C 315.1C
A012	H12	1	16287T 16519C 195C 263G 315.1C
A013	K2a5	1	16224C 16311C 16519C 73G 146C 152C 263G 315.1C 324T 551G
A014	T1a	1	16126C 16186T 16189C 16264T 16294T 16519C 73G 152C 263G 315.1C
A015	W1e1	1	16223T 16292T 16295T 16311C 16519C 73G 143A 189G 195C 204C 207A 263G 315.1C

A016	T2b	1	16126C 16243C 16294T 16296T 16304C 16519C 73G 204C 207A 263G 315.1C
A017	H	1	16189C 16193.1C 16193.2C 16362C 16519C 263G 309.1C 315.1C 523DEL 524DEL
A018	H34	1	16093C 16291T 16519C 152C 263G 315.1C
A019	R0	1	16519C 263G 309.1C 309.2C 315.1C
A020	H12	1	16287T 16519C 195C 263G 309.1C 315.1C
A021	J1c+16261	1	16069T 16126C 16261T 73G 263G 295T 309.1C 315.1C 462T 489C 524.1A 524.2C
A022	T2c1a	1	16126C 16292T 16294T 16519C 73G 263G 309.1C 315.1C 507C 524.1A 524.2C 524.3A 524.4C 573.1C 573.2C 573.3C 573.4C 573.5C 573.6C
A023	R0	1	16519C 263G 315.1C
A024	V	1	16294T 16298C 16311C 72C 263G 309.1C 315.1C
A025	U5b2a1a+16311	1	16192T 16311C 16380T 73G 150T 263G 309.1C 309.2C 315.1C 538G 573.1C
A026	R0	1	263G 309.1C 315.1C 523DEL 524DEL
A027	U5a1a2	1	16256T 16270T 16399G 73G 263G 309.1C 315.1C 573.1C 573.2C
A028	H12	1	16287T 16519C 195C 263G 315.1C
A029	H12	1	16287T 16519C 195C 263G 315.1C
A030	H7c4	1	16092C 16183C 16189C 16265C 16291T 16519C 75A 263G 309.1C 315.1C
A031	J1c+16261	1	16069T 16126C 16261T 73G 263G 295T 315.1C 462T 489C
A032	H31	1	16519C 73G 146C 152C 195C 263G 309.1C 309.2C 315.1C
A033	H+195	1	16287T 16519C 195C 252C 263G 315.1C
A034	U4c1	1	16179T 16356C 73G 263G 315.1C 499A
A035	H10e3a	1	16221T 16519C 152C 263G 315.1C
A036	HV1	1	16067T 16311C 263G 309.1C 309.2C 315.1C
A037	K1a+150	1	16093Y 16224C 16311C 16519C 73G 150T 263G 315.1C 497T
A038	H55	1	16189C 16193.1C 16193.2C 16357C 16519C 153G 263G 309.1C 309.2C 315.1C
A039	H1at	1	16304C 16519C 239C 263G 315.1C
A040	H5a1+16093	1	16093C 16304C 263G 315.1C 456T 523DEL 524DEL
A041	H11a2	1	16092C 16293G 16311C 146C 195C 263G 315.1C
A042	V21	1	16298C 16390A 16519C 263G 309.1C 315.1C
A043	U4a1	1	16134T 16356C 16519C 73G 152C 195C 263G 309.1C 315.1C 499A
A044	H7a1a	1	16261T 16304C 16519C 93G 263G 315.1C 523DEL 524DEL

A045	U4	1	16356C 16519C 73G 195C 263G 309.1C 315.1C 499A 524.1A 524.2C
A046	H12	1	16287T 16519C 195C 263G 315.1C
A047	H55	1	16189C 16193.1C 16193.2C 16519C 153G 263G 309.1C 309.2C 315.1C
A048	U5a1+@16192	1	16256T 16270T 16399G 73G 263G 309.1C 315.1C 523DEL 524DEL
A049	H	1	16311C 57Y 263G 315.1C
A050	H11a2	1	16092C 16293G 16311C 152C 195C 263G 315.1C
A051	H55	1	16189C 16193.1C 16193.2C 16519C 153G 263G 309.1C 309.2C 315.1C
A052	H35	1	16311C 16519C 146C 263G 315.1C
A053	R0a2	1	16114T 16126C 16258C 16319A 16362C 16519C 57.1C 64T 152C 263G 309.1C 315.1C
A054	W1+119	1	16193T 16223T 16292T 16519C 73G 119C 152C 189G 195C 204C 207A 263G 315.1C
A055	T1a1+@152	1	16126C 16163G 16186T 16189C 16294T 16519C 73G 195C 263G 309.1C 315.1C
A056	H5	1	16304C 16344T 263G 309.1C 309.2C 315.1C 456T 523DEL 524DEL
A057	H14a	1	16256T 16352C 195C 263G 309.1C 309.2C 315.1C
A058	V	1	16148T 16298C 16311C 72C 263G 309.1C 315.1C
A059	R0a1a	1	16126C 16355T 16362C 58C 64T 146C 152C 263G 309.1C 315.1C
A060	H12	1	16287T 16357C 16519C 195C 263G 315.1C
A061	R0a2k1	1	16114T 16126C 16258C 16319A 16362C 16519C 60.1T 64T 152C 263G 309.1C 309.2C 315.1C
A062	X2c1b	1	16183C 16189C 16193.1C 16223T 16255A 16278T 16300G 16519C 73G 153G 195C 225A 227G 263G 315.1C
A063	H11a2	1	16092C 16293G 16311C 146C 195C 263G 315.1C
A064	W3b	1	16172C 16223T 16231C 16292T 16519C 73G 189G 194T 195C 199C 204C 207A 210G 263G 309.1C 315.1C
A065	H1e2b	1	16129A 16175G 16519C 263G 309.1C 315.1C
A066	H5n	1	16304C 263G 315.1C 373G 456T
A067	H13b1+200	1	16261T 16519C 200G 263G 309.1C 315.1C
A068	U4c1	1	16051G 16179T 16356C 16362C 16519C 73G 195C 263G 315.1C 499A
A069	T2b	1	16126C 16183C 16189C 16193.1C 16294T 16296T 16304C 16519C 73G 152C 263G 309.1C 309.2C 315.1C
A070	R0a1a	1	16126C 16355T 16362C 58C 64T 146C 152C 263G 309.1C 315.1C
A071	W3b	1	16172C 16223T 16231C 16292T 16519C 73G 152C 189G 194T 195C 199C 204C 207A 210G 263G 309.1C 315.1C
A072	U3b2b	1	16093C 16343G 16362C 73G 150T 195C 263G 315.1C 523DEL 524DEL

A073	W3b	1	16172C 16223T 16231C 16292T 16519C 73G 189G 194T 195C 199C 204C 207A 210G 263G 309.1C 315.1C
A074	J1c	1	16069T 16126C 16220C 16519C 73G 185A 228A 263G 295T 309.1C 315.1C 462T 489C 523DEL 524DEL
A075	H15	1	55C 57C 263G 309.1C 309.2C 315.1C 523DEL 524DEL
A076	T2b	1	16126C 16243C 16294T 16296T 16304C 16519C 73G 204C 207A 263G 315.1C
A077	X2d	1	16183C 16189C 16193.1C 16223T 16227G 16278T 16287T 16290T 16519C 73G 195C 263G 309.1C 309.2C 315.1C
A078	M	1	16223T 16362C 16519C 73G 263G 309.1C 315.1C 489C
A079	J1c2e	1	16069T 16126C 16366T 16519C 73G 185A 188G 228A 263G 295T 309.1C 309.2C 315.1C 462T 489C 523DEL 524DEL
A080	U4	1	16356C 16519C 73G 195C 263G 309.1C 315.1C 499A 524.1A 524.2C
A081	H3ak	1	16519C 143A 228A 263G 309.1C 315.1C
A082	I1	1	16129A 16223T 16311C 16390A 16391A 16519C 73G 199C 204C 250C 263G 315.1C 455.1T 573.1C 573.2C 573.3C
A083	H12	1	16287T 16519C 195C 263G 315.1C
A084	V17	1	16129A 16298C 72C 195C 263G 315.1C
A085	H1e1a	1	55C 56.1C 263G 309.1C 309.2C 315.1C
A086	H5a1	1	16304C 150T 263G 309.1C 315.1C 456T 523DEL 524DEL
A087	X2+225	1	16189C 16223T 16278T 16519C 73G 153G 195C 225A 226Y 263G 315.1C
A088	T2b	1	16126C 16294T 16296T 16304C 16519C 73G 263G 315.1C
A089	H13b1+200	1	16261T 16519C 200G 263G 309.1C 315.1C
A090	H1e1a	1	55C 56.1C 263G 309.1C 309.2C 315.1C
A091	M5a1	1	16129A 16223T 16291T 16519C 73G 195C 263G 309.1C 315.1C 489C
A092	J1c+16261	1	16069T 16126C 16261T 73G 263G 295T 309.1C 315.1C 462T 489C
A093	W1+119	1	16193T 16223T 16292T 16519C 73G 119C 152C 189G 195C 204C 207A 263G 315.1C
A094	U4a1	1	16134T 16356C 16519C 73G 152C 195C 263G 309.1C 315.1C 499A
A095	H5m	1	16304C 146C 263G 309.1C 309.2C 315.1C 456T 573.1C 573.2C 573.3C
A096	W	1	16193T 16223T 16292T 16519C 73G 152C 189G 195C 204C 207A 263G 315.1C
A097	R0	1	263G 309.1C 315.1C
A098	U4a2f	1	16356C 16519C 73G 195C 198T 263G 310C 315DEL 316DEL 317DEL 499A
A099	J1c2	1	16069T 16126C 16519C 73G 185A 188G 228A 263G 295T 315.1C 462T 489C
A100	H11a+152	1	16239T 16293G 16311C 152C 195C 263G 315.1C
A101	J1c+16261	1	16069T 16126C 16261T 73G 185A 263G 295T 309.1C 315.1C 462T 489C

A102	R0	1	16519C 263G 309.1C 309.2C 315.1C
A103	H12	1	16287T 16519C 195C 263G 315.1C
A104	H	1	16256T 263G 309.1C 309.2C 315.1C
A105	T2b3+151	1	16126C 16294T 16296T 16304C 16519C 73G 151T 263G 315.1C
A106	U1a1a	1	16092C 16189C 16249C 16294T 73G 195C 263G 285T 315.1C 385G 523DEL 524DEL
A107	H5	1	16294T 16304C 263G 315.1C 456T
A108	H11a+152	1	16293G 16311C 152C 195C 263G 315.1C 444R
A109	l1a	1	16129A 16172C 16223T 16311C 16391A 16519C 73G 199C 204C 250C 263G 315.1C 455.1T 573.1C 573.2C 573.3C 573.4C 573.5C
A110	U5b2a5	1	16189C 16193.1C 16193.2C 16270T 16311C 16519C 73G 150T 263G 309.1C 315.1C 523DEL 524DEL
A111	H	1	16189C 16193.1C 16193.2C 16519C 152C 263G 309.1C 315.1C
A112	H5m	1	16304C 146C 263G 309.1C 309.2C 315.1C 456T 573.1C 573.2C 573.3C 573.4C
A113	H1a	1	16162G 16519C 73G 263G 309.1C 315.1C 471C
A114	J1c4b	1	16069T 16126C 16169T 16183C 16189C 16193.1C 73G 185A 228A 263G 295T 309.1C 315.1C 462T 489C
A115	V	1	16298C 16311C 72C 263G 309.1C 315.1C
A116	H12	1	16287T 16519C 195C 263G 315.1C
A117	H55	1	16183M 16189C 16193.1C 16193.2C 16519C 153G 204C 263G 309.1C 309.2C 315.1C
A118	U1a1a	1	16092C 16189C 16193.1C 16193.2C 16249C 16294T 73G 195C 263G 285T 315.1C 385G 523DEL 524DEL
A119	H44b	1	16051G 16312G 16519C 195C 263G 309.1C 315.1C
A120	U4a1	1	16129A 16134T 16356C 16519C 73G 152C 195C 263G 315.1C 499A
A121	R0	1	263G 309.1C 315.1C 523DEL 524DEL
A122	H12	1	16287T 16519C 195C 263G 315.1C
A123	K1a12a1a	1	16129A 16224C 16311C 73G 185A 263G 315.1C 497T 524.1A 524.2C
A124	H11a2	1	16092C 16265T 16293G 16311C 146C 195C 263G 315.1C
A125	H59	1	16519C 73G 263G 315.1C 573.1C 573.2C
A126	R0	1	16519C 263G 309.1C 315.1C
A127	H	1	16311C 263G 315.1C
A128	J1c+16261	1	16069T 16126C 16261T 73G 263G 295T 309.1C 315.1C 462T 489C
A129	H61	1	16216G 16519C 146C 263G 315.1C
A130	R0	1	16519C 263G 309.1C 315.1C

A131	H5m	1	16304C 146C 263G 309.1C 309.2C 315.1C 456T 573.1C 573.2C 573.3C
A132	R	1	16235R 73G 263G 315.1C 523DEL 524DEL
A133	V	1	16148T 16298C 16311C 72C 186M 263G 309.1C 315.1C
A134	H8+(114)+152	1	16288C 16362C 114T 146C 152C 195C 263G 309.1C 315.1C 319C
A135	T2c1a	1	16126C 16292T 16294T 16519C 73G 263G 315.1C 573.1C 573.2C 573.3C 573.4C 573.5C
A136	H12	1	16287T 16519C 195C 263G 309.1C 309.2C 315.1C
A137	T1a1+@152	1	16126C 16163G 16186T 16189C 16294T 16519C 73G 195C 263G 309.1C 315.1C
A138	V	1	16298C 16311C 72C 263G 309.1C 315.1C
A139	W6	1	16124C 16192T 16223T 16292T 16325C 16356C 16519C 73G 189G 194T 195C 204C 207A 263G 309.1C 315.1C
A140	X2+225	1	16183C 16189C 16193.1C 16223T 16278T 16519C 73G 153G 195C 225A 226C 263G 309.1C 315.1C
A141	H12	1	16287T 16519C 195C 263G 315.1C
A142	H55	1	16189C 16193.1C 16193.2C 16519C 153G 263G 309.1C 315.1C
A144	I1	1	16129A 16223T 16311C 16390A 16391A 16519C 73G 199C 204C 250C 263G 315.1C 455.1T 573.1C 573.2C 573.3C 573.4C
A145	U5b1c2	1	16174T 16189C 16270T 16311C 73G 150T 263G 309.1C 315.1C 516T
A146	W+194	1	16223T 16292T 16519C 73G 189G 194T 195C 204C 207A 263G 309.1C 315.1C
A147	I1a	1	16129A 16172C 16223T 16311C 16391A 16519C 73G 199C 204C 250C 263G 315.1C 455.1T 573.1C 573.2C 573.3C 573.4C 573.5C
A148	H12	1	16287T 16519C 195C 263G 315.1C
A149	H51	1	16189C 16193.1C 16193.2C 16519C 204C 263G 309.1C 315.1C

#, означува испитаник

Табела 8. Секвенца на целиот контролен регион кај турски испитаници, со прикажани разлики во споредба со rCRS. Одредени се и хаплогрупите кај секој испитаник.

#	ХАПЛОГРУПА		ХАПЛОТИП
T001	H2a1	1	16354T 16519C 263G 309.1C 315.1C
T002	H2a1	1	16354T 16519C 263G 309.1C 315.1C
T003	J1b8	1	16069T 16126Y 16145A 16260T 16261T 73G 152C 263G 295T 315.1C 462T 489C
T004	H1j1a	1	16129A 16316R 16519C 195C 263G 315.1C
T005	H12	1	16287T 16519C 195C 263G 315.1C

T006	K1a5a	1	16224C 16311C 16362C 16519C 73G 263G 315.1C 497T 524.1A 524.2C
T007	U1a	1	16126C 16182C 16183C 16189C 16249C 16353T 16360T 16362C 73G 183G 263G 285T 309.1C 315.1C
T008	H27a	1	16129A 16316G 16519C 195C 263G 315.1C
T009	K1a4	1	16093Y 16224C 16311C 16519C 73G 195C 263G 315.1C 417A 497T 501T 524.1G 524.2C
T010	T1a	1	16126C 16163G 16186T 16189C 16294T 16519C 73G 263G 309.1C 315.1C 513A
T011	H11a2	1	16092C 16293G 16311C 152C 195C 263G 315.1C
T012	H1c	1	16519C 214R 263G 315.1C 477C
T013	H1c	1	16519C 263G 309.1C 315.1C 477C
T014	H1bt	1	16126C 16192T 16234T 16527T 263G 315.1C
T015	H6	1	16362C 16482G 16519C 239C 263G 315.1C
T016	T1a1+@152	1	16126C 16163G 16186T 16189C 16294T 16418C 16519C 73G 195C 263G 309.1C 315.1C
T017	H12	1	16287T 16519C 195C 263G 315.1C
T018	H	1	16519C 152C 263G 315.1C
T019	H7c1	1	16093Y 16265G 16519C 263G 309.1C 315.1C
T020	HV0f	1	16185T 16298C 195C 263G 309.1C 315.1C
T021	U4b1a1a1	1	16356C 16362C 16519C 73G 195C 214R 263G 315.1C 499A
T022	W3b	1	16172C 16223T 16231C 16292T 16519C 73G 189G 194T 195C 199C 204C 207A 210G 263G 315.1C
T023	T1a2a	1	16126C 16163G 16186T 16189C 16261T 16294T 16519C 73G 152C 263G 309.1C 315.1C 384G
T024	H12	1	16287T 16519C 195C 263G 315.1C
T025	U4c1	1	16051G 16179T 16356C 16362C 16519C 73G 195C 263G 315.1C 499A 524.1A 524.2C
T026	U5a1+@16192	1	16256T 16270T 16399G 73G 263G 309.1C 315.1C
T027	U5a1a1+16362	1	16256T 16270T 16362C 16399G 73G 146C 263G 309.1C 309.2C 315.1C
T028	R0	1	16519C 263G 309.1C 315.1C
T029	H	1	16256T 263G 309.1C 315.1C
T030	H27a	1	16129A 16316G 16519C 195C 263G 315.1C
T031	U1a	1	16086C 16183C 16189C 16193.1C 16249C 16319A 73G 263G 285T 309.1C 309.2C 315.1C
T032	U3	1	16343G 73G 150T 263G 315.1C
T033	U1a1a	1	16092C 16189C 16193.1C 16249C 16294T 16519C 73G 195C 263G 285T 315.1C 385G 523DEL 524DEL
T034	W3b	1	16172C 16223T 16231C 16292T 16519C 73G 189G 194T 195C 199C 204C 207A

			210G 263G 309.1C 315.1C
T035	J1c+16261	1	16069T 16126C 16189Y 16261T 73G 263G 295T 309.1C 315.1C 462T 489C 527T
T036	W3b	1	16172C 16223T 16231C 16292Y 16519C 73G 189G 194T 195C 199C 204C 207A 210G 263G 309.1C 315.1C
T037	U5a1b1	1	16192T 16256T 16260T 16270T 16291T 16399G 73G 263G 315.1C
T038	T2b	1	16126C 16294T 16296T 16304C 16519C 73G 152C 263G 315.1C
T039	T2b	1	16126C 16294T 16296T 16304C 16519C 73G 152C 263G 315.1C
T040	W3b	1	16172C 16223T 16231C 16292T 16519C 73G 189G 194T 195C 199C 204C 207A 210G 263G 309.1C 315.1C
T041	H59	1	16519C 73G 263G 315.1C 573.1C 573.2C 573.3C
T042	R0	1	16519C 195A 263G 315.1C
T043	R0	1	16519C 195A 263G 315.1C
T044	R0	1	16519C 195A 263G 315.1C
T045	T1	1	16126C 16163G 16294T 16519C 73G 263G 309.1C 315.1C
T046	R0	1	16519C 242T 263G 309.1C 309.2C 315.1C
T047	U5a1+@16192	1	16256T 16270T 16399G 73G 263G 309.1C 315.1C
T048	U5a1b1	1	16192T 16256T 16260T 16270T 16291T 16399G 73G 263G 315.1C
T049	T2b	1	16126C 16294T 16296T 16304C 16519C 73G 152C 263G 315.1C
T050	U5a2a	1	16114A 16192T 16256T 16270T 16294T 16526A 73G 263G 309.1C 315.1C
T051	U5a2a	1	16114A 16192T 16256T 16270T 16294T 16526A 73G 263G 309.1C 315.1C
T052	U5a1b1	1	16192T 16256T 16260T 16270T 16291T 16399G 73G 195Y 263G 315.1C
T053	R0	1	16519C 195A 263G 315.1C
T054	W3b	1	16172C 16223T 16231C 16292T 16519C 73G 189G 194T 195C 199C 204C 207A 210G 263G 309.1C 315.1C
T055	J2a2c	1	16069T 16126C 16231C 73G 150T 195C 263G 295T 309.1C 315.1C 489C 524.1A 524.2C
T056	T1	1	16126C 16163G 16294T 16519C 73G 263G 309.1C 315.1C
T057	T1	1	16126C 16163G 16294T 16519C 73G 263G 309.1C 315.1C
T058	I5a	1	16129A 16148T 16223T 16391A 16519C 73G 199C 204C 250C 263G 309.1C 315.1C 573.1C 573.2C 573.3C
T059	J1c	1	16069T 16126C 73G 185A 263G 295T 309.1C 315.1C 462T 489C
T060	T1	1	16126C 16163G 16294T 16519C 73G 263G 309.1C 315.1C
T061	V	1	16214Y 16298C 16311C 72C 263G 309.1C 315.1C
T062	J1c	1	16069T 16126C 73G 185A 263G 295T 309.1C 315.1C 462T 489C

T063	T2b	1	16126C 16294T 16296T 16304C 16519C 73G 152C 263G 315.1C
T064	U5a1+@16192	1	16256T 16270T 16399G 73G 263G 309.1C 315.1C
T065	H1c	1	16519C 263G 309.1C 315.1C 477C
T066	U5a1b1	1	16192T 16256T 16260T 16270T 16291T 16399G 73G 263G 315.1C
T067	R0	1	16519C 263G 309.1C 315.1C
T068	T2b	1	16126C 16294T 16296T 16304C 16519C 73G 263G 315.1C
T069	U5a1+@16192	1	16256T 16270T 16399G 73G 263G 309.1C 315.1C
T070	R0	1	16465T 16519C 263G 315.1C
T071	H1c	1	16519C 263G 309.1C 315.1C 477C
T072	T2b5a1	1	16126C 16294T 16304C 16519C 3C 73G 263G 309.1C 315.1C
T073	H9a	1	16168T 16519C 152C 263G 309.1C 309.2C 315.1C
T074	T2f2	1	16126C 16140C 16189C 16193.1C 16294T 16296T 16311C 16519C 73G 195C 198T 263G 309.1C 315.1C
T075	W6	1	16192T 16223T 16292T 16325C 16519C 73G 189G 194T 195C 204C 207A 263G 309.1C 315.1C 524.1A 524.2C
T076	H11	1	16301T 16311C 195C 263G 315.1C
T077	T2b11	1	16126C 16294T 16304C 16519C 73G 152Y 204C 207A 263G 309.1C 315.1C
T078	J1c4b	1	16069T 16126C 16183C 16189C 16193.1C 73G 185A 228A 263G 295T 315.1C 462T 489C
T079	U4c1	1	16051G 16179T 16356C 16362C 16519C 73G 195C 263G 315.1C 499A 524.1A 524.2C
T080	J1c2e	1	16069T 16126C 16366T 16519C 73G 185A 188G 228A 263G 295T 309.1C 315.1C 462T 489C 523DEL 524DEL
T081	H+195	1	16124C 16519C 143A 263G 315.1C
T082	H	1	16519C 195C 263G 309.1C 309.2C 315.1C
T083	H2a2a1	1	16291T 315.1C
T084	H28	1	16519C 186A 263G 309.1C 315.1C
T085	H10+(16093)	1	16093Y 16519C 263G 315.1C 315.2C
T086	M7b1a1+(16192)	1	16129A 16192T 16223T 16297C 73G 150T 199C 263G 315.1C 456T 489C
T087	H59	1	16519C 73G 214R 263G 315.1C 573.1C 573.2C 573.3C
T088	K1a	1	16224C 16301T 16311C 16519C 73G 263G 315.1C 497T 524.1A 524.2C 524.3A 524.4C
T089	U5a1a2	1	16256T 16270T 16399G 73G 263G 309.1C 315.1C 573.1C 573.2C 573.3C 573.4C
T090	W6d	1	16192T 16223T 16292T 16325C 16519C 73G 152C 185A 189G 194Y 195C 198T 204C 207A 263G 315.1C
T091	R0a1a	1	16126C 16311C 16355T 16362C 64T 146C 263G 309.1C 309.2C 315.1C 523DEL 524DEL 573.1C 573.2C 573.3C 573.4C 573.5C

T092	H6a1a2a	1	16362C 41T 239C 263G 309.1C 309.2C 315.1C
T093	H26a	1	16093C 16519C 210G 263G 315.1C 315.2C
T094	H10e3a	1	16221T 16519C 152C 263G 315.1C
T095	H3	1	16129A 16519Y 263G 309.1C 315.1C 385G
T096	R0	1	16519C 263G 309.1C 315.1C
T097	H11	1	16301T 16311C 195C 263G 315.1C
T098	U4a1	1	16134T 16356C 16519C 73G 152C 195C 263G 309.1C 315.1C 499A
T099	H13b1+200	1	16181G 16261T 16519C 200G 263G 315.1C
T100	H7a1a	1	16261T 16304C 16519C 93G 263G 315.1C 523DEL 524DEL
T101	H3k	1	16145A 16519C 152C 200G 263G 315.1C
T102	U4a2	1	16356C 16519C 73G 195C 263G 310C 315DEL 316DEL 317DEL 499A
T103	U2d1	1	16051G 16093C 16184T 16189C 16234T 16294T 16311C 16342C 16519C 73G 152C 199C 309.1C 315.1C 471C
T104	K1b1a1	1	16221T 16224C 16311C 16319A 16519C 73G 152C 263G 309.1C 315.1C 524.1A 524.2C
T105	R0	1	16465T 16519C 263G 309.1C 315.1C
T106	T2b	1	16126C 16129A 16224C 16271C 16294T 16296T 16304C 16519C 73G 263G 315.1C 315.2C
T107	J1c	1	16069T 16126C 16304C 73G 185A 263G 295T 315.1C 462T 489C
T108	H2a2a1	1	16291T 315.1C
T109	H2a1	1	16354T 16519C 263G 309.1C 309.2C 315.1C
T110	U4a2	1	16356C 16519C 73G 195C 263G 310C 315DEL 316DEL 317DEL 499A
T111	H2a2a1	1	16291T 315.1C
T112	H	1	16519C 195C 263G 309.1C 309.2C 315.1C
T113	H5	1	16304C 263G 309.1C 315.1C 456T
T114	H13b1+200	1	16181G 16261T 16519C 200G 263G 315.1C
T115	H3k	1	16145A 16519C 152C 200G 263G 315.1C
T116	U4a2	1	16356C 16519C 73G 195C 263G 310C 315DEL 316DEL 317DEL 499A
T117	R0	1	16465T 16519C 263G 309.1C 315.1C
T118	H15	1	55C 57C 61T 263G 309.1C 309.2C 315.1C
T119	H55	1	16189C 16193.1C 16193.2C 16519C 153G 263G 309.1C 309.2C 315.1C
T120	H41a	1	16293C 262T 263G 309.1C 315.1C 573.1C

T121	U5a1a1+152	1	16256T 16270T 16399G 73G 152C 263G 309.1C 309.2C 315.1C
T122	H15	1	55C 57C 61T 263G 309.1C 309.2C 315.1C
T123	V3c	1	16216G 16298C 263G 309.1C 315.1C
T124	R0	1	16465T 16519C 263G 309.1C 315.1C
T125	H	1	16189C 16519C 263G 315.1C 523DEL 524DEL
T126	T2	1	16126C 16286G 16294T 16296T 16519C 73G 189R 263G 309.1C 315.1C
T127	H6	1	16362C 16482G 16519C 239C 263G 315.1C
T128	X2m	1	16189C 16193.1C 16223T 16278T 16362C 16519C 73G 143A 152C 195C 225A 226C 263G 315.1C
T129	H55	1	16189C 16193.1C 16193.2C 16519C 146C 153G 204C 263G 309.1C 309.2C 315.1C
T130	H	1	16189C 16193.1C 16362C 16519C 263G 309.1C 315.1C 523DEL 524DEL
T131	R0	1	16519C 263G 315.1C
T132	H12	1	16287T 16519C 195C 263G 315.1C
T133	U5b2a5	1	16189C 16270T 16311C 73G 150T 263G 309.1C 315.1C
T134	U5b2a5	1	16189C 16193.1C 16270T 16311C 73G 150T 263G 309.1C 315.1C
T135	U5a1+@16192	1	16256T 16270T 16399G 16519C 73G 263G 309.1C 315.1C
T136	l1a	1	16129A 16172C 16223T 16311C 16391A 16519C 73G 199C 204C 250C 263G 315.1C 455.1T 573.1C 573.2C 573.3C 573.4C 573.5C
T137	H	1	16093Y 16311C 16519C 263G 315.1C 523DEL 524DEL
T138	U3	1	16343G 73G 150T 263G 309.1C 315.1C
T139	H1e2b	1	16129A 16175G 16519C 263G 309.1C 315.1C
T140	K1a6	1	16124C 16170G 16224C 16311C 16519C 16527T 73G 263G 315.1C 497T 524.1A 524.2C 524.3A 524.4C
T141	H	1	16519C 146C 263G 315.1C
T142	H	1	16519C 146C 263G 315.1C
T143	J1c+16261	1	16069T 16126C 16261T 73G 263G 295T 309.1C 315.1C 462T 489C
T144	R0	1	16519C 263G 315.1C
T145	H	1	16311C 263G 315.1C
T146	H1a	1	16162G 16519C 73G 263G 309.1C 315.1C
T147	R0	1	263G 309.1C 315.1C
T148	H61	1	16216G 16519C 146C 263G 315.1C
T149	H12	1	16287T 16519C 195C 263G 315.1C

T150	R	1	73G 263G 315.1C 523DEL 524DEL
------	---	---	-------------------------------

#, означува испитаник

Табела 9. Секвенца на целиот контролен регион кај ромски испитаници, со прикажани разлики во споредба со rCRS. Одредени се и хаплогрупите кај секој испитаник.

#	ХАПЛОГРУПА		ХАПЛОТИП
R001	U3	1	16343G 73G 150T 263G 315.1C 519R
R002	M5a1	1	16129A 16148T 16223T 16291T 16298C 16519C 73G 263G 310C 489C 524.1A 524.2C
R003	U2d3	1	16051G 16189C 16234T 16266T 16294T 16519C 73G 152C 199C 309.1C 315.1C 471C
R004	I1a1	1	16129A 16172C 16223T 16311C 16391A 16519C 73G 199C 203A 204C 250C 263G 315.1C 455.1T 573.1C 573.2C 573.3C
R005	H7a1a	1	16261T 16304C 16519C 93G 263G 315.1C 523DEL 524DEL
R006	H7a1a	1	16261T 16304C 16519C 93G 263G 315.1C 523DEL 524DEL
R007	X2e1	1	16126C 16189A 16223T 16278T 16519C 73G 153G 195C 225A 226C 263G 315.1C
R008	M5a1b	1	16129A 16223T 16291T 16298C 16519C 73G 263G 309.1C 315.1C 489C 524.1A 524.2C
R009	H2a1	1	16354T 16519C 263G 309.1C 315.1C
R010	H7a1a	1	16261T 16304C 16519C 93G 263G 315.1C 523DEL 524DEL
R011	H	1	16183C 16189C 16193.1C 16362C 16519C 263G 309.1C 309.2C 315.1C 523DEL 524DEL
R012	M5a1b	1	16129A 16223T 16291T 16298C 16519C 73G 263G 309.1C 315.1C 489C 524.1A 524.2C
R013	X2b+226	1	16183C 16189C 16193.1C 16223T 16278T 16519C 73G 146C 153G 195C 225A 226C 263G 309.1C 315.1C
R014	M5a1	1	16129A 16223T 16291T 16519C 73G 195C 263G 309.1C 315.1C 489C
R015	I1a1	1	16129A 16172C 16223T 16311C 16391A 16519C 73G 199C 203A 204C 250C 263G 315.1C 455.1T 573.1C 573.2C 573.3C
R016	H7a1a	1	16261T 16304C 16519C 93G 263G 315.1C 523DEL 524DEL
R017	M5a1b	1	16129A 16223T 16291T 16298C 16362Y 16519C 73G 263G 309.1C 315.1C 489C 524.1A 524.2C
R018	X2e1	1	16126C 16189A 16223T 16278T 16519C 73G 153G 195C 225A 226C 263G 315.1C
R019	H7a1a	1	16261T 16304C 16519C 93G 263G 315.1C 523DEL 524DEL
R020	M5a1	1	16129A 16148T 16223T 16291T 16298C 16519C 73G 263G 310C 315DEL 489C 524.1A 524.2C
R021	N1b1a+16129	1	16086C 16129A 16145A 16176G 16223T 16390A 16519C 73G 152C 228A 263G 315.1C
R023	K1b1a1	1	16224C 16311C 16319A 16519C 73G 152C 263G 315.1C 505T 524.1A 524.2C 524.3A 524.4C 524.5A 524.6C

R025	M5a1b	1	16129A 16223T 16291T 16298C 16519C 73G 263G 309.1C 309.2C 315.1C 489C
R026	H7a1a	1	16261T 16519C 93G 263G 315.1C 523DEL 524DEL
R027	M5a1	1	16129A 16148T 16223T 16291T 16298C 16519C 73G 263G 310C 315DEL 489C 524.1A 524.2C
R028	M5a1	1	16129A 16223T 16291T 16519C 73G 195C 263G 309.1C 315.1C 489C
R029	M5a1	1	16129A 16223T 16291T 16519C 73G 195C 263G 309.1C 315.1C 489C
R030	H13a1a1	1	150T 152C 263G 310C 315DEL
R031	M5a1	1	16129A 16223T 16291T 16519C 73G 195C 263G 309.1C 315.1C 489C
R032	X2e1	1	16126C 16189A 16223T 16278T 16519C 73G 153G 195C 225A 226C 263G 315.1C
R033	H20	1	16218T 16278T 93G 263G 315.1C
R034	M5a1b	1	16129A 16223T 16291T 16298C 16519C 73G 263G 309.1C 315.1C 489C
R035	K2a	1	16224C 16311C 16519C 73G 146C 152C 263G 315.1C
R036	J1c2a2	1	16069T 16126C 16256T 16519C 73G 185A 188G 228A 263G 295T 315.1C 462T 482C 489C
R037	X2e1	1	16126C 16189A 16223T 16278T 16519C 73G 153G 195C 225A 226C 263G 315.1C
R038	H7a1a	1	16261T 16304C 16519C 93G 263G 315.1C 523DEL 524DEL
R039	M5a1b	1	16129A 16223T 16291T 16298C 16519C 73G 263G 309.1C 315.1C 489C
R040	M18a	1	16223T 16318T 16519C 73G 93G 194T 246C 263G 309.1C 315.1C 489C
R041	H26a	1	16093Y 16519C 210G 263G 315.1C 315.2C
R042	X2e1	1	16126C 16189A 16223T 16278T 16519C 73G 153G 195C 225A 226C 263G 315.1C
R043	J1c2a2	1	16069T 16126C 16256T 16519C 73G 185A 188G 228A 263G 295T 315.1C 462T 482C 489C
R044	R0	1	16519C 263G 315.1C
R045	T1b	1	16093C 16126C 16163G 16183C 16189C 16193.1C 16243C 16294T 16519C 73G 263T 309.1C 315.1C
R046	H1ao	1	16218T 16278T 93G 263G 315.1C 523DEL 524DEL
R047	M5a1	1	16129A 16223T 16291Y 16519C 73G 195C 263G 309.1C 315.1C 489C
R048	J2b	1	16069T 16126C 16193T 16227R 73G 150T 152C 263G 295T 315.1C 489C 508G 523DEL 524DEL
R049	U3	1	16343G 73G 150T 263G 315.1C
R050	M5a1b	1	16129A 16223T 16291T 16298C 16327T 16519C 73G 263G 309.1C 309.2C 315.1C 489C 524.1A 524.2C
R051	l1a1	1	16129A 16172C 16223T 16311C 16391A 16519C 73G 199C 203A 204C 250C 263G 309.1C 315.1C 455.1T 573.1C 573.2C 573.3C
R052	M5a1	1	16129A 16148T 16223T 16291T 16298C 16519C 73G 263G 310C 315DE 489C 524.1A 524.2C
R053	M5a1	1	16129A 16223T 16291T 16519C 73G 195C 263G 309.1C 315.1C 489C

R054	H10b	1	16399G 16519C 146C 263G 309.1C 309.2C 315.1C
R055	H11a2a	1	16092C 16140C 16293G 16311C 195C 263G 315.1C
R056	l1a1	1	16129A 16172C 16223T 16311C 16391A 16519C 73G 199C 203A 204C 250C 263G 315.1C 455.1T 573.1C 573.2C 573.3C 573.4C 573.5C
R057	H	1	16519C 146C 152C 195C 263G 315.1C
R058	J1c2a2	1	16069T 16126C 16256T 16519C 73G 185A 188G 228A 263G 295T 315.1C 462T 482C 489C
R059	M18a	1	16172C 16223T 16318T 16519C 73G 93G 194T 246C 263G 309.1C 315.1C 489C
R060	J1b6a	1	16069T 16126C 16145A 16222T 73G 195C 263G 315.1C 462T 489C
R061	J2a2c	1	16069T 16126C 16231C 73G 150T 195C 263G 295T 309.1C 315.1C 489C 524.1A 524.2C
R062	M5a1	1	16129A 16223T 16291T 16319A 16519C 73G 195C 263G 309.1C 315.1C 489C
R063	M5a1b	1	16129A 16223T 16291T 16298C 16519C 73G 214R 263G 309.1C 309.2C 315.1C 489C 524.1A 524.2C
R064	M5a1b	1	16129A 16223T 16291T 16298C 16519C 73G 263G 309.1C 315.1C 489C
R065	X2e1	1	16126C 16189A 16223T 16278T 16519C 73G 153G 195C 225A 226C 263G 315.1C
R066	T2b	1	16126C 16294T 16296T 16304C 16519C 73G 263G 315.1C
R067	H7a1a	1	16261T 16304C 16519C 93G 263G 315.1C 523DEL 524DEL
R068	X2e1	1	16126C 16189A 16223T 16278T 16519C 73G 153G 195C 225A 226C 263G 315.1C
R069	R0	1	16519C 263G 315.1C
R070	H9a	1	16168T 16519C 152C 263G 309.1C 309.2C 315.1C
R071	U1a	1	16086C 16183C 16189C 16249C 16319A 73G 263G 285T 309.1C 309.2C 315.1C
R072	M18a	1	16223T 16318T 16519C 73G 93G 194T 246C 263G 315.1C 489C
R073	M5a1	1	16129A 16223T 16291T 16519C 73G 195C 263G 309.1C 315.1C 489C
R074	J2b	1	16069T 16126C 16193T 73G 150T 152C 263G 295T 315.1C 489C 508G 523DEL 524DEL
R075	X2e1	1	16126C 16189A 16223T 16278T 16519C 73G 153G 195C 225A 226C 263G 315.1C
R076	T1a1'3	1	16126C 16163G 16186T 16189C 16294T 16519C 73G 152C 195C 263G 315.1C
R077	M5a1	1	16129A 16148T 16223T 16291T 16298C 16519C 73G 263G 310C 315DE 489C 524.1A 524.2C
R078	M5a1	1	16129A 16148T 16223T 16291T 16298C 16519C 73G 263G 310C 315DEL 489C 524.1A 524.2C
R079	M5a1b	1	16129A 16223T 16291T 16298C 16519C 73G 152C 263G 309.1C 315.1C 489C 524.1A 524.2C
R080	H1ax1	1	16189C 16192T 150T 263G 309.1C 315.1C
R081	J1c1	1	16069T 16126C 73G 185A 228A 263G 295T 315.1C 462T 482C 489C 508G
R082	l1	1	16129A 16223T 16311C 16391A 16519C 73G 199C 204C 250C 263G 315.1C 455.1T

			573.1C 573.2C
R083	I1	1	16129A 16223T 16311C 16391A 16519C 73G 199C 204C 250C 263G 315.1C 455.1T 573.1C 573.2C
R084	J1b3a	1	16069T 16126C 16145A 16222T 16235G 16261T 16271C 16519C 73G 263G 295T 309.1C 315.1C 462T 489C
R085	H7a1a	1	16261T 16304C 16519C 93G 263G 315.1C 523DEL 524DEL
R086	U2e1a1a	1	16051G 16129C 16182C 16183C 16189C 16362C 16519C 73G 152C 263G 309.1C 309.2C 315.1C 340T 508G 524.1A 524.2C
R087	R0	1	16519C 263G 315.1C
R088	R0	1	16519C 263G 315.1C
R089	T1b	1	16126C 16163G 16183C 16189C 16243C 16294T 16519C 73G 263T 309.1C 309.2C 315.1C
R090	K2a	1	16224C 16311C 16519C 73G 146C 152C 263G 315.1C
R091	M5a1	1	16129A 16148T 16223T 16291T 16298C 16519C 73G 263G 310C 315DEL 489C 524.1A 524.2C
R092	H7a1a	1	16261T 16304C 16519C 93G 263G 315.1C 523DEL 524DEL
R093	U3	1	16343G 73G 150T 263G 315.1C
R094	R0	1	16519C 263G 315.1C
R095	U4a2a	1	16183G 16354T 16519C 73G 195C 263G 310C 499A 524.1A 524.2C
R096	J1c1	1	16069T 16126C 73G 185A 228A 263G 295T 315.1C 462T 482C 489C 508G
R097	J1c1	1	16069T 16126C 73G 185A 228A 263G 295T 315.1C 462T 482C 489C 508G
R098	J2b	1	16069T 16126C 16193T 73G 150T 152C 263G 295T 315.1C 489C 508G 523DEL 524DEL
R099	R0	1	16519C 263G 315.1C
R100	M5a1b	1	16129A 16223T 16291T 16298C 16519C 73G 263G 309.1C 315.1C 489C
R101	M5a1b	1	16129A 16223T 16291T 16298C 16519C 73G 263G 309.1C 315.1C 489C 524.1A 524.2C
R102	H	1	16311C 263G 315.1C
R103	M5a1b	1	16129A 16223T 16291T 16298C 16519C 73G 263G 309.1C 309.2C 315.1C 489C 524.1A 524.2C
R104	T1b	1	16126C 16163G 16183C 16189C 16193.1C 16243C 16294T 16519C 73G 263T 309.1C 309.2C 315.1C
R105	M5a1b	1	16129A 16223T 16291T 16298C 16519C 73G 263G 309.1C 315.1C 489C 524.1A 524.2C
R106	M5a1b	1	16129A 16223T 16291T 16298C 16519C 73G 263G 309.1C 309.2C 315.1C 489C
R107	M5a1	1	16129A 16223T 16291T 16319A 16519C 73G 195C 263G 309.1C 315.1C 489C
R108	M5a1	1	16129A 16223T 16291T 16519C 73G 195C 263G 309.1C 315.1C 489C
R109	X2e1	1	16126C 16189A 16223T 16278T 16519C 73G 153G 195C 225A 226C 263G 315.1C
R110	X2e1	1	16126C 16189A 16223T 16278T 16519C 73G 153G 195C 225A 226C 263G 315.1C

R111	M5a1b	1	16129A 16223T 16291T 16298C 16519C 73G 263G 309.1C 309.2C 315.1C 489C 524.1A 524.2C
R112	H76	1	16093C 16311C 16519C 152C 263G 309.1C 315.1C
R113	T1b	1	16126C 16163G 16183C 16189C 16193.1C 16243C 16294T 16519C 73G 263T 309.1C 309.2C 315.1C
R114	M5a1	1	16129A 16223T 16291T 16519C 73G 195C 263G 309.1C 315.1C 489C
R115	H7a1a	1	16261T 16304C 16519C 93G 146Y 263G 315.1C 523DEL 524DEL
R116	H1ax1	1	16189C 16192T 150T 263G 309.1C 315.1C
R117	H11a2	1	16092C 16169T 16293G 16311C 263G 315.1C
R118	l1a1	1	16129A 16172C 16223T 16311C 16391A 16519C 73G 199C 203A 204C 250C 263G 315.1C 455.1T 573.1C 573.2C 573.3C 573.4C
R119	T1b	1	16126C 16163G 16183C 16189C 16193.1C 16243C 16294T 16519C 73G 263T 309.1C 309.2C 315.1C
R121	U3	1	16343G 73G 150T 263G 315.1C
R122	J1b	1	16069T 16126C 16145A 16222T 16261T 16311C 73G 234R 263G 295T 315.1C 462T 489C
R123	H	1	16093Y 16311C 16519C 152C 263G 309.1C 315.1C
R124	H13a1a1	1	150T 152C 263G 310C 315DEL
R125	U3	1	16343G 73G 150T 183R 263G 315.1C
R126	M5a1b	1	16129A 16223T 16291T 16298C 16519C 73G 152C 263G 309.1C 315.1C 489C 524.1A 524.2C
R127	H7a1a	1	16261T 16304C 16519C 93G 263G 315.1C 523DEL 524DEL
R128	H55	1	16189C 16193.1C 16390A 16519C 153G 204C 263G 309.1C 315.1C
R129	H1ax1	1	16189C 16192T 150T 263G 309.1C 315.1C
R130	J1c	1	16069T 16126C 73G 185A 228A 263G 295T 315.1C 462T 489C 499R
R131	N1b1a+16129	1	16086C 16129A 16145A 16176G 16223T 16390A 16519C 73G 152C 228A 263G 309.1C 315.1C
R132	H13a1a	1	16180G 16519C 263G 309.1C 315.1C
R133	H7a1a	1	16261T 16304C 16519C 93G 263G 315.1C 523DEL 524DEL
R134	U3	1	16343G 73G 150T 263G 315.1C
R135	T1b	1	16126C 16163G 16183C 16189C 16193.1C 16243C 16294T 16519C 73G 263T 309.1C 309.2C 315.1C 385G
R136	H1ax1	1	16189C 16192T 150T 263G 309.1C 315.1C
R137	R0	1	16519C 263G 315.1C
R138	H7a1a	1	16261T 16304C 16519C 93G 263G 315.1C 523DEL 524DEL
R139	H	1	16051G 16519C 195C 263G 309.1C 315.1C
R140	U3	1	16343G 73G 150T 263G 315.1C

R141	M5a1	1	16129A 16223T 16291T 16519C 73G 195C 263G 309.1C 315.1C 489C
R142	X2e1	1	16126C 16189A 16223T 16278T 16519C 73G 153G 195C 225A 226C 263G 315.1C
R143	H	1	16311C 263G 309.1C 309.2C 315.1C
R144	M5a1	1	16129A 16223T 16291T 16319A 16519C 73G 195C 263G 309.1C 315.1C 489C
R145	K2a	1	16224C 16311C 16519C 73G 146C 152C 263G 315.1C
R146	H	1	16311C 263G 309.1C 309.2C 315.1C
R147	M5a1b	1	16129A 16223T 16291T 16298C 16519C 73G 263G 309.1C 315.1C 489C 524.1A 524.2C
R148	H7a1a	1	16261T 16304C 16519C 93G 263G 315.1C 523DEL 524DEL
R149	H5	1	16186T 16304C 263G 315.1C 456T

#, означува испитаник

Како што може да се види од табелите, кај албанската популација со 43% и кај турската популациска група со 40% е застапена хаплогрупата H, која е најчесто застапена и кај македонската популација од Република Македонија [102], а исто така и кај други европски популации. Помеѓу мтДНК- хаплогрупите во Европа, хаплогрупата H е со најширока географска дистрибуција и со највисока фреквенција. Претходни студии предлагаат дека хаплогрупата H настанала на Средниот Исток пред околу 25-30 000 години, па се проширила во Европа. Поради високата фреквенција и широката дистрибуција, хаплогрупата H најверојатно учествувала во сите последователни епизоди на генетски проток “gene flow” во западна Евроазија [127].

Кај ромската етничка група од Република Македонија, најзастапени се хаплогрупите M со 28% и H со 27,3%. Хаплогрупата M е честа хаплогрупа во источна Африка и во Азија, но ретко се сретнува во Европа [128]. Во хаплогрупата M, сите линии се од азиско потекло, освен една линија M1a1 од источна Африка која е најдена кај две португалски ромски семејства. Главните азиски супхаплогрупи се: M5a1a, M18, M25 и M35b, за кои е објавено дека се со индиско потекло [129,130,131,132,133]. M5a1 е најчеста азиска супхаплогрупа која се сретнува кај ромската популација (6-29%). Кај ромските испитаници од Република Македонија, супхаплогрупата M5a1 е застапена со висока честота од 13,7%. Втора по честота кај Ромите од Македонија е хаплогрупата H со 27,3% и нејзината супхаплогрупа H7a1a со честота од 10%. Хаплогрупата H со 5-10% се сретнува во Индија и во централна Азија [134]. Присуството на хаплогрупата H кај Ромите може да се должи на мешањето на Ромите со европските популации по нивното населување во Европа. Еден од најчестите хаплотипови од хаплогрупата H кај Ромите е 16261-16304, кој е многу редок во европската популација [135], што може да е резултат на настаната мутација [136] или на

многубројни независни мешања на популацијата. Овој хаплотип е застапен и кај Ромите од Република Македонија со честота од 10%.

Хаплогрупите кои се застапени со средна честота кај трите популации се следниве: кај албанската популација, тоа се хаплогрупите: Т (13,5%), U (12,8%) и R0 (10%); кај турската етничка група, тоа се хаплогрупите: U (19,3%), Т (12%) и R0 (10,6%); кај ромската популација, тоа се хаплогрупите: J (9,5%) и U (7,5%).

Од форензички аспект, посебно е интересно тоа што етничките групи кои се анализирани во оваа студија имаат различна застапеност на одделни хаплотипови. Кај Албанците, најмногу е застапена хаплогрупата H12 (8,78%), која е генерално ретко застапена во други популации; објавени се податоци кај ортодоксните Македонци со 3% [103], кај популација од северна Грција со 1,25% [137] и кај турските испитаници од нашата популациона студија со 3,3%.

Кај Ромите, со најголема честота се застапени хаплогрупите: M5a1 (13,7%) и H7a1a (10,27%).

Дистрибуцијата на хаплогрупите кај етничките групи (Албанци, Турци и Роми) во Република Македонија е прикажана во табела 10.

Табела 10. Дистрибуција на хаплогрупи кај трите етнички групи во Република Македонија

Хаплогрупи	Албанци	Роми	Турци
H7a1a	1 (0,67%)	15 (10,27%)	1 (0,66%)
H12	13 (8,78%)	0	5 (3,33%)
M5a1*	1 (0,67%)	20 (13,7%)	0
M5a1b	0	18 (12,3%)	0
W	9 (6,08%)	0	7 (4,66%)
X2e1	0	11 (7,5%)	0

Специфичностите во застапеноста на хаплотиповите кај одделните етнички групи укажуваат на потребата од посебни бази на податоци за форензички цели за да може да се добие поголема прецизност при статистичка обработка на форензичките случаи. Овие популациони податоци ќе бидат достапни на ЕМРОР-базата на податоци на интернет, под пристапните броеви: ЕМР00644 за Албанците, ЕМР00645 за Ромите и ЕМР00646 за Турците од Република Македонија.

1.1. Анализа на разликиџе на мтДНК кај испитанициџе

Нуклеотидните секвенци беа анализирани и интерпретирани со употреба на Sequencher (V.5.1, GeneCodes Corporation), подредени во сооднос со Андерсоновата секвенца [34], следејќи ги правилата за филогенетско подредување дефинирани од Vandelt и Parson [138]. Хаплогрупите на мтДНК беа одредени со софтверот EMMA [124] врз основа на филогенетското дрво (www.phyloree.org). Веројатноста за случајно совпаѓање беше пресметана како сума на квадратните корени од фреквенцијата на хаплотиповите [139]. Индексите на генетски диверзитет беа пресметани со употреба на софтверот Arlequin (верзија 3.1.) [120]. Варијантите на должинските низи од С-нуклеотиди во HV1 (околу 16193), HV2 (околу 390) и HV3 (околу 573) беа игнорирани во пресметувањето на веројатноста за случајно совпаѓање и во индексите на генетски диверзитет.

Популационите податоци ќе бидат достапни на EMBOP-базата на податоци на интернет, под пристапните броеви: EMP00644 за Албанците, EMP00645 за Ромите и EMP00646 за Турците од Република Македонија.

Анализата на секвенцата на мтДНК-контролниот регион во трите македонски етнички групи со вкупно 444 испитаници (148 Албанци, 150 Турци и 146 Роми) покажа 108 различни хаплотипови (73%) кај Албанците, 100 (66,6%) кај Турците и 64 (42%) кај Ромите. Од овде, 87 (80,5%), 74 (74%) и 42 (65,6%) се единствени хаплотипови и хаплотипната разновидност е 0,983, 0,986 и 0,966 соодветно за албанската, турската и ромската група на испитаници (табела 11).

Табела 11. Статистички разлики за контролниот регион (16024-576) кај трите македонски етнички групи

Популациона статистика	Албанци	Турци	Роми
Вкупен број	148	150	146
Број на хаплотипови	108	100	64
Број на полиморфни места	138	137	98
Број на единствени хаплотипови	87	74	42
Веројатност на случајно совпаѓање	0,017	0,014	0,034
Хаплотипна разновидност	0,983	0,986	0,966
Средна вредност "pairwise differences"	9,5	8,6	10,7

Во однос на популационите студии, при споредба на честотата на хаплогрупите кај трите етнички групи од Република Македонија, Албанци, Турци и Роми меѓу себе, а исто така и при споредба со македонската етничка група од Република Македонија [104] и други јужноевропски популации кај кои е направена анализа на целиот контролен регион од мтДНК, како што се популациите од северна Грција и Кипар [137], унгарските Ашкенази [140],

унгарските бараниа Роми и Унгарците од Будимпешта [141], романската популација чанго и шекеле [142] и романските Власи [143], изработени со AMOVA-програмата, беа утврдени мали меѓупопулациски разлики (табела 12).

Табела 12. Резултати од AMOVA (Analysis of Molecular Variance) d.f. значи степен на слобода “degree of freedom”

Варијации	d.f.	Сума од квадрати	Компоненти на варијации	Процент на варијации
Помеѓу популациите	10	405,891	0.19635 Va	3,73
Во популациите	1997	10109,979	5.06258 Vb	96,27
Целосно	2007	10515,871	5,25893	
Индекс на фиксација	FST:	0,03734		

Како што може да се види од табела 12, повеќето од варијациите се однесуваат на разлики во популациите (96,27%), додека варијациите помеѓу различни популации е 3,73%.

Во табела 13 е прикажана Fst-споредба меѓу наведените популации.

Табела 13. Fst-споредба меѓу популациите. Fst-вредностите се под дијагоналата, а p-вредностите (сигнификантно $p < 0,05$, не е сигнификантно $p > 0,05$) се над дијагоналата.

#	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	*	0,018	<0.001	0,135	<0.001	0,009	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
2	0,005	*	<0.001	<0.001	<0.001	0,009	<0.001	<0.001	0,054	<0.001	<0.001
3	0,047	0,052	*	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
4	0,002	0,006	0,045	*	<0.001	0,396	<0.001	<0.001	0,027	<0.001	0,144
5	0,023	0,027	0,047	0,015	*	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
6	0,004	0,005	0,039	0,000	0,016	*	<0.001	<0.001	0,090	<0.001	0,198
7	0,055	0,056	0,084	0,044	0,030	0,046	*	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
8	0,086	0,093	0,020	0,085	0,085	0,081	0,120	*	<0.001	<0.001	<0.001
9	0,008	0,003	0,041	0,004	0,019	0,001	0,050	0,080	*	<0.001	0,072
10	0,036	0,041	0,065	0,026	0,021	0,027	0,046	0,105	0,028	*	<0.001
11	0,006	0,007	0,036	0,001	0,017	0,001	0,048	0,073	0,002	0,026	*

Ознаките за популациите се следни: 1. македонски Албанци; 2. македонски Турци; 3. македонски Роми; 4. Македонци; 5. грчка популација од Кипар; 6. грчка популација од северна Грција; 7. унгарски Ашкенази; 8. унгарски **барања? Роми; 9. Унгарци од Будимпешта; 10. романска популација чанго; 11. романска популација шекели.**

Направена е и споредба со популациите од некои од соседните и географски блиски земји [95, 109, 132] кај кои се објавени резултати само за секвенцата на двата хиперваријабилни региона HV1 и HV2 од контролниот регион. Резултатите се прикажани во табела 14.

2. Анализа на форензички случаи во тек на изработката на докторската дисертација

2.1. Идентификација на леш со напреднати трулежни промени

По барање на Основното јавно обвинителство од Скопје, спроведена е идентификација на НН тело извадено од реката Вардар, обдуцирано во Институтот за судска медицина, криминалистика и медицинска деонтологија во Скопје. Телото беше делумно сапонифицирано, а внатрешните органи беа со напреднати трулежни промени, што приближно одговараше за смрт настаната пред 5-6 месеци (слика 17).



Слика 17. НН тело извадено од р. Вардар, идентификувано со генетска анализа.

Како материјал за изолација на ДНК беше земен дел од бутната коска, а добиениот профил за мтДНК и STR-ите од коската беше спореден со профилите добиени од претпоставената ќерка на покојната, единственото нејзино дете. Од ќерката, односно од референтниот примерок, беа земени крв и брис од усната слuzница. Постапката на работење е детално опишана во *Материјал и методи*.

Пред статистичката обработка на резултатите, важни се податоците за случајот (криминалистичката обработка на случајот) и форензичкиот наод, посебно специфичните карактеристики на телото на лешот утврдени во текот на обдукцијата. Овие елементи ја даваат претходната претпоставка "prior probability", односно веројатноста телото кое го идентификуваме да е мајка на претпоставената ќерка пред да се направи ДНК-тестот. Во конкретниот случај, претходната веројатност поврзана со приказната беше одредена дека е 50%. Статистичката калкулација на добиениот ДНК-резултат се изведе врз основа на поставена хипотеза, во конкретниот случај хипотезата е дека лешот е мајка на претпоставената ќерка или дека не се во крвно сродство. По направената статистичка калкулација на добиените ДНК-профили, претходно одредената веројатност и поставената хипотеза

D:M+Man

/

со DNAVIEW-програмата за STR-ите добивме Likelihood Ratio LR=188 и крајна веројатност "posterior probability" 99,47%. Likelihood Ratio претставува сооднос на две веројатности од ист настан под различни хипотези. За идентификација, posterior probability треба да биде минимум 99,9 % за потврда на хипотезата. Затоа беше потребно да се направи анализа на дополнителен генетски материјал кај примероците, односно беше направена анализа на мтДНК бидејќи стануваше збор за мајка и претпоставена ќерка, па доколку се биолошки поврзани, мајката и ќерката ќе имаат иста мтДНК. Анализата на мтДНК покажа ист хаплотип кај мајката и претпоставената ќерка. Разликите со Андерсоновата секвенца се прикажани во табелите 15 и 16.

Табела 15. Резултати од анализа на мтДНК-секвенца за HV1-регионот

HV1 (позиција 16024-16365)		
Андерсонова секвенца	16224	16311
	T	T
HH	C	C
ќерка	C	C

Табела 16. Резултати од анализа на мтДНК-секвенца за HV2-регионот

HV2 (позиција 73-340)				
Андерсонова секвенца	73 A	94 G	263 A	315.1 -
НН	G	A	G	C
ќерка	G	A	G	C

Резултатот беше вклучен во статистичката пресметка на тој начин што posterior probability од анализата на STR-ите сега е prior probability за мтДНК, односно 0,994 posterior за STR-и, е приор за мтДНК. LR за мтДНК се пресметува од EMPOP-базата на податоци за мтДНК и во конкретниот случај добивме вредност 201. Ако пресметаме:

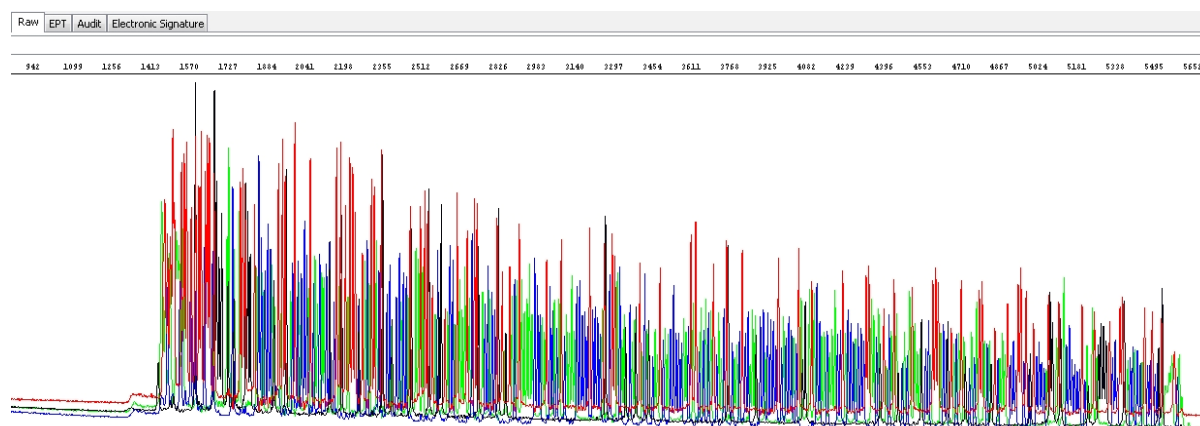
$$LR_c = LR_{str} \times LR_{mtDNA} = 188 \times 201 = 37788$$

$$PP_c = LR_c \times \text{prior} / LR_c \times \text{prior} + (1 - \text{prior}) \times 100\%$$

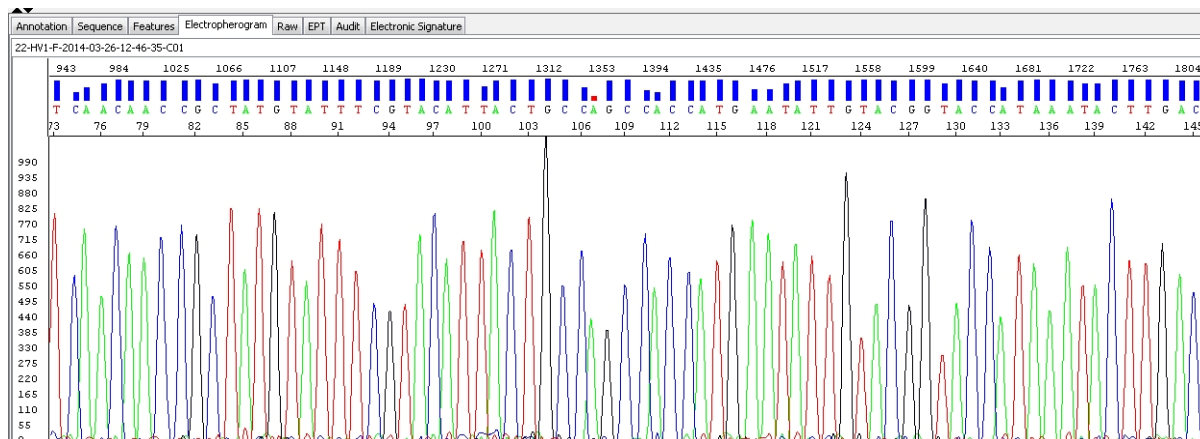
$$= 37788 \times 0,994 / 37788 \times 0,994 + 0,006 \times 100\%$$

$$= 37561,272 / 37561,278 \times 100\% = 99,99998\%$$

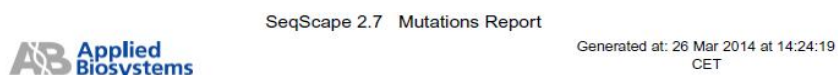
се доби веројатност од 99,99998%, што е силен доказ во прилог на хипотезата дека телото кое го идентификуваме е мајка на претпоставената ќерка. На сликите 18, 19 и 20 е прикажан дел од анализата на примерокот коска.



Слика 18. "Сурови" податоци (raw data) добиени во тек на електрофорезата од мтДНК-примерокот од коска



Слика 19. Электроферограм. Приказ на дел од секвенциониранит продукт од мтДНК-примерокот од коска



Specimen	Base Change	ROI	Position	Length	Type	Quality	Known	Effect	Aa Change	Description
Specimen1	16224t>C	HV1	16224	1	Sub	48	yes	silent	-	
Specimen1	16311t>C	HV1	16311	1	Sub	46	yes	nonsense	S231*	
Specimen2	73a>G	HV2	73	1	Sub	50	yes	missense	M1V	
Specimen2	94g>A	HV2	94	1	Sub	50	yes	missense	D8N	
Specimen2	263a>G	HV2	263	1	Sub	50	yes	missense	H64R	

Слика 20. На слика 19, прикажани се полиморфизмите на примерокот од коска (16224C, 16311C, 73G, 94A, 263G) во HV1 и HV2-регионот во споредба со Андерсоновата секвенца. Идентичен резултат е добиен и од анализата на мтДНК од ќерката.

2.2. Утврдување на прв степен крвно сродство

По приватна молба со барање да се одреди крвно сродство, од барателот на експертизата, односно жената беше побарано преку нејзиниот брат да утврдиме дали се брат и сестра или не се во крвно сродство, односно дали е посвоено дете од фамилијата со која живеела. За решавање на овој форензички случај повторно беше неопходна анализа на мтДНК, која беше направена на начин опишан во *Материјал и методи*, бидејќи со анализата на STR-ите по статистичка обработка на резултатот со DNAVIEW-програмата, со поставена хипотеза дека жената и мажот се сестра и брат или дека не се во крвно сродство:

S: Ma+Pa

B: Ma+Pa

/

добивме LR= 27,9 и posterior probability 93%. За исполнување на критериумот од 99,9% вклучивме анализа на мтДНК со која беше анализирана нивната биолошка поврзаност по мајка. Разликите во споредба со Андерсоновата секвенца и добиените резултати од анализата на мтДНК на сестрата и братот се прикажани во табелите 17 и 18.

Табела 17. Резултати од анализа на мтДНК-секвенца за HV1-регионот

HV1 (позиција од 16024 до 16365)			
Андерсонова секвенца	16069	16126	16256
сестра	T	C	T
брат	T	C	T

Табела 18. Резултати од анализа на мтДНК-секвенца за HV2-регионот

HV2 (позиција од 73 до 340)							
Андерсонова секвенца	73	185	188	228	263	295	315.1
	A	G	A	G	A	C	-
сестра	G	A	G	A	G	T	C
брат	G	A	G	A	G	T	C

Како што може да се види од табелите, кај сестрата и братот беше утврден ист хаплотип на мтДНК. Полиморфизмите се утврдуваат при споредба со Андерсоновата секвенца.

Во статистичката пресметка се сумираат веројатностите добиени при анализа на STR-и и анализа на мтДНК, односно:

$$LR_c = LR_{str} \times LR_{mtDNA} = 27,9 \times 201 = 5608$$

$$PP_c = LR_c \times \text{prior} / LR_c \times \text{prior} + (1 - \text{prior}) \times 100\%$$

$$= 5608 \times 0,5 / 5608 \times 0,5 + 0,5 \times 100\%$$

$$= 99,97\%.$$

Веројатноста од 99,97% е доволна за да ја потврдиме поставената хипотеза дека лицата се со прв степен на сродство, односно сестра и брат.

VI. Заклучоци

1. Преку изработката на оваа докторска студија беше воведена нова метода за добивање и анализа на хумана митохондријална ДНК, наследниот материјал кој го добиваме од нашите мајки. Оваа софистицирана и деликатна за работење метода има примена во форензичките генетски лаборатории. Во текот на изработката на докторската студија, со примена на анализа на мтДНК беа решени форензички случаи каде што анализата на STR-и не беше доволна за добивање на резултат со потребната статистичка веројатност од 99,9% за искористливост на резултатот.

2. Во докторската студија беше анализиран контролниот регион на мтДНК кај 444 испитаници кои живеат во Република Македонија. Со анализата на 444 испитаници од три етнички групи од Република Македонија, Албанци (148 испитаници), Турци (150 испитаници) и Роми (146 испитаници), за најполиморфниот регион на мтДНК (контролен регион) се овозможи формирање на база на податоци за овие етнички групи, а со тоа и проширување на постојната база на податоци за контролниот регион на мтДНК која во моментот ги содржи само податоците за ортодоксните Македонци кои живеат на територијата на Република Македонија. Оваа база на податоци се користи за добивање на поголема прецизност при статистичка обработка на добиените резултати од форензичките генетски испитувања. Овие податоци ќе бидат дел од EMPOP-базата на податоци (empop.org) која содржи секвенци за контролниот регион на мтДНК на популации од сите делови на светот и е достапна преку интернет.

3. Анализата на секвенцата на контролниот регион на мтДНК од трите етнички групи од Република Македонија (148 Албанци, 150 Турци и 146 Роми) покажа 108 различни хаплотипови (73%) кај Албанците, 100 (66,6%) кај Турците и 64 (42%) кај Ромите. Од овде, 87 (80,5%), 74 (74%) и 42 (65,6%) се единствени хаплотипови и хаплотипната разновидност е 0.983, 0.986 и 0.966 соодветно за албанската, турската и ромската група на испитаници.

4. По направената класификација на добиените хаплотипови во хаплогрупи кај трите популации беа утврдени одредени разлики помеѓу испитаниците кај различни групи. Кај албанската и турската популација најчесто застапена хаплогрупа е хаплогрупата H со 43% кај албанската и со 40% кај турската популација. Оваа хаплогрупа е најчесто застапена и кај останатите европски популации. Кај ромската етничка група од Република Македонија, хаплогрупата H е застапена со 27,3%, додека најзастапена е хаплогрупата M со 28%. Освен хаплогрупата H, кај албанската и турската популација се застапени и другите главни европски хаплогрупи: I, J, K, T, U, V, W и X. Кај ромската популација се застапени и хаплогрупите: I, J, K, T, U и X.

5. Од форензички аспект, интересно е тоа што етничките групи кои се анализирани во оваа студија имаат различна застапеност на одделни хаплогрени. Кај Албанците најмногу е застапена хаплогрупата H12 (8,78%), која е генерално ретко застапена во други популации. Објавени се податоци за хаплогрупата H12 кај ортодоксните Македонци со застапеност од 3%, кај популацијата од северна Грција со 1,25% и кај турската популациска група од Република Македонија со 3,3%. Кај Ромите со најголема честота е застапена хаплогрупата M5a1 (13,7%), која е честа во јужна Азија, како и хаплогрупата H7a1a (10,27%).

6. Наодот на поголемата застапеност на различни хаплогрупи кај одделни популации вклучени во оваа студија, како што се хаплогрупата H12 кај албанската популација и хаплогрупите M5a1 и H7a1a кај ромската популација, е важен податок при анализа на криминалистички примероци во одредување на идентитетот, односно припадноста на анализираниот форензички материјал. Доколку при анализа на биолошката трага добиеме некоја од овие хаплогрупи, тогаш во истрагата ќе се стесни кругот на популацијата каде што ќе се насочи истрагата или понатамошниот “matching”, односно пребарувањето ќе се насочи во популациската група која со најголема честота ја содржи одредената хаплогрупа на биолошката трага. Овој податок добиен во текот на истражувањето претставува научен придонес за форензичката експертиза.

7. Со одредување на хаплогрупата на мтДНК и доколку е таа од хаплогрупите кои се карактеристични или почести кај одредена популациска група, водејќи ја истрагата во точен правец по добивањето на овие податоци, значително ќе се намалат материјалните трошоци за форензичката експертиза и ќе се забрза процесот на решавање на форензичкиот случај.

VII. Литература

1. Jeffreys J.Alec, Turner Michael, Debenham Paul. The efficiency of multilocus DNA fingerprint probes for individualization and establishment of family relationships, determined from extensive casework. *Am.J.Hum.Genet.*1991;48:824-840
2. Amade Mcharek. Silent witness, articulate collective: DNA evidence and the inference of visible traits. *Bioethics.*2008;22:519-528
3. Wambaugh J, editor. *The bleeding.*Bantam Press; 1989
4. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro:the polymerase chain reaction. *Cold spring harbor. Symp Quant Biol.*1986.51:263-273
5. Holland MM, Fisher DL, Roby RK, Ruderman J, Bryson C, Weedn VW. Mitochondrial DNA sequence analysis of human remains. Identification of Remains from The Vietnam War.*Journal of Forensic Science.*1993;38(3):542-553
6. Cavalier-Smith T. The origin of nuclei and of eukaryotic cells. *Nature.* 1975; 256:463-468
7. Margulis L.Symbiosis in cell evolution:Life and its environment in the early earth. W.H.Freeman, San Francisco.1981
8. Gray MW. The endosymbiont hypotesis revised. *Int Rev Cytol.* 1992;141:233
9. Lang BF, Burger G, O2Kelly CJ, Cedergren R, Golding GB, Lemieux C, Sankoff D., Turmel M, Gray MW: An ancestral mitochondrial DNA resembling a eubacterial genome in miniature. *Nature.* 1997; 387:493
10. Satoh M, Kuroiwa T.Organization of multiple nucleotides and DNA molecules in mitochondria of a human cell. *Experimental Cell Research.*1991;196:137-140
11. Robin ED, Wong R. Mitochondrial DNA molecules and virtual number of mitochondria per cell in mammalian cells. *Journal of Cellular Physiology.*1988; 136:507-513.
12. Chen X, Prosser R, Simonetti S, Sadlock J, Jagiello G, Schon A. Rearranged Mitochondrial Genomes are Present in Human Oocytes. *Am.J.Hum.Genet.*1995;57:239-247
13. Parson TJ, Muniec DS, Sullivan K, Woodyatt N, Alliston-Greiner, Wilson MR, Berry DL, Holland KA, Weedn VW, Gill P, Holland MM. A high observed substitution rate in the human mitochondrial DNA control region. *Nat Genet.*1997;15:363

14. Hagelberg E, Goldman N, Lio P et al. Evidence for mitochondrial DNA recombination in a human population of island Melanesia. *Proceedings of the Royal Society of London B Biological Science*, 1999; 266:485-492
15. Eyre-Walker A, Smith NH, Smith JM. How clonal are human mitochondria? *Proceedings of the Royal Society of London B Biological Sciences*, 1999; 266:477-483
16. Awadalla P, Eyre-Walker A, Maynard SJ. Linkage disequilibrium and recombination in hominid mitochondrial DNA. *Science*, 1999; 286:2524-2525
17. Gyllensten U et al. Paternal inheritance in mitochondrial DNA in mice. *Nature*, 1991; 352:255-257
18. Macaulay V et al. Mitochondrial DNA recombination-no need to panic. *Proceedings of the Royal Society of London B Biological Sciences*, 1999; 266:2037-2039
19. Parson TJ, Irwin JA. Questioning evidence for recombination in human mitochondrial DNA. *Science*, 2000; 288:1931
20. Kivisild T et al. Questioning evidence for recombination in human mitochondrial DNA. *Science*, 2000; 288:1931
21. Jorde LB, Bamshad M. Questioning evidence for recombination in human mitochondrial DNA. *Science*, 2000; 288:1931
22. Kumar S, Hedrick P, Dowling T et al. Questioning evidence for recombination in human mitochondrial DNA. *Science*, 2000; 288:1931
23. Hagelberg E, Goldman N, Lio P et al. Erratum: Evidence for mitochondrial DNA recombination in a human population of island Melanesia. *Proceedings of the Royal Society of London B Biological Science*, 2000; 267:1595-1596
24. Ingman M, Kaessmann H, Paablo S, Gyllensten U. Mitochondrial genome variation and the origin of modern humans. *Nature*, 2000; 408:708-713
25. Elson JL, Andrews RM, Chinnery PF, et al. Analysis of European mtDNAs for recombination. *Am J Hum Genet*, 2001; 68:145-153
26. Wiuf C. Recombination in human mitochondrial DNA? *Genetics*, 2001; 159:749-756
27. Herrnstadt C et al. Reduced-median-network analysis of complete mitochondrial DNA coding-region sequences for the major African, Asian and European haplogroups. *American Journal of Human Genetics*, 2002;70:1152-1171
28. Schwartz M, Vissing J. Paternal inheritance of mitochondrial DNA. *New England Journal of Medicine*, 2002; 347:576-580

29. Johns DR. Paternal transmission of mitochondrial DNA is (fortunately) rare. *Annals of Neurology*, 2003; 54:422-424
30. Filosto M et al. Lack of paternal inheritance of muscle mitochondrial DNA in sporadic mitochondrial myopathies. *Annals of neurology*. 2003; 54:524-526
31. Taylor RW, et al. Genotypes from patients indicate no paternal mitochondrial DNA contribution. *Annals of Neurology*, 2003; 54:521-524
32. Giles RE et al. Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1980; 77:6715-6719
33. Bodenteich A et al. Dinucleotide repeat in mitochondrial D-loop. *Human molecular Genetics*.1992; 1:140
34. Szibor R et al. Mitochondrial D-loop 3' (CA)_n repeat polymorphism: Optimization of analysis and population data. *Electrophoresis*.1997; 18:2857-2860
35. Scheffler IE. *Mitochondria*. New York: Wiley-Liss.1999
36. Anderson S, Bankier AT, Barrell GB, deBruijn MHL, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJH, Staden R, Young IG. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*. 1981;290:457-465
37. Parson W, Parson TJ, Scheithauer R, Holland M. Population data for 101 Austrian Caucasian mitochondrial DNA D-loop sequence: application of mtDNA sequence analysis to a forensic case. *Int J Legal Med*. 1998;111(3)124-132
38. Lutz S, Weisser H-J, Heizmann J et al. A third hypervariable region in the human mitochondrial D-loop. *Hum Genet*.1997;101:384
39. Lutz S, Witting H, Weisser H-J, et al. Is it possible to differentiate mtDNA by means of HV2I in samples that cannot be distinguished by sequencing the HV1 and HV2 regions?. *Forensic Sci Int*.2000;113:97-101
40. Naigai A, Nakamura I, Bunai Y. Sequence analysis of mitochondrial DNA HVIII region in a Japanese population. 2004;1261:410-412
41. Bini C, Ceccardi S, Luiselli D et al. Different informativeness of the three hypervariable mitochondrial DNA regions in the population of Bologna (Italy). *Forensic Sci Int*.2003;135:48-52
42. Yhang YJ, Xu QS, Zheng ZJ et al. Haplotype diversity in mitochondrial DNA hypervariable region I, II and III in northes China Han. *Forensic Sci Int*.2005;149:267-269

43. Stoneking M. Hypervariable sites in the mtDNA control region are mutational hotspots. *American Journal of Human Genetics*, 2000; 67:1029-1032
44. Wilson MR, Stoneking M, Holland MM, DiZinno JA, Budowle B. Guidelines for the use of mitochondrial DNA sequencing in forensic science. *Crime Lab Digest*.1993; 20:68
45. Budowle B, Wilson MR, DiZinno JA, Stauffer C, Fasano MA, Holland MM, Monson KL. Mitochondrial DNA regions HVI and HVII population data. *Forensic Science International*.1999;103:23-25
46. Stoneking M et al. Population variation of human mtDNA control region sequences detected by enzymatic amplification and sequence-specific oligonucleotide probes. *American Journal of Human genetics*, 1991; 48:370-382
47. Tully G et al. Rapid detection of mitochondrial sequence polymorphisms using multiplex solid-phase fluorescent minisequencing. *Genomics*, 1996; 34:107-113
48. Comas D et al. Analysis of mtDNA HVRII in several human populations using an immobilised SSO probes hybridization assay. *European Journal of Human Genetics*, 1999;7:459-468
49. Gabriel MN et al. Identification of human remains by immobilized sequence-specific oligonucleotide probe analysis of mrtDNA hypervariable regions I and II. *Croatian Medical Journal*, 2003; 44:293-298
50. Sanger F, Nicklen S, Coulson R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc.Natl.Acad.Sci*.1977; 74:5463-5467
51. Wilson MR, DiZinno JA, Polanskey D, Replogle J, Budowle B. Validation of mitochondrial DNA sequencing for forensic casework analysis. *Int J Legal Med*.1995; 108(2):68-74
52. Andrews RM, Kubacka I, Chinnery PF, Lightowlers RN, Turnbull DM, Howell N. Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nature Genetics* 1999.23:147
53. <http://www.mitomap.org/mitoseq.htm>
54. Melton T. Mitochondrial DNA heteroplasmy. *Forensic Science Review*. 2004;16:1-20
55. Phlugradt R, et al. A novel and effective separation method for single mitochondria analysis. *Mitochondrion*, 2011; 11:308-314
56. Reiner JE, et al. Detection of heteroplasmic mitochondrial DNA in single mitochondria. *PloS ONE*, 2010; 5:e14359

57. Comas et al. Heteroplasmy in the control region of human mitochondrial DNA. *Genome Research*.1995;5:89-90
58. Bendal K.E et al. Heteroplasmic point mutations in the human mtDNA control region. *American Journal of Human Genetics*. 1996; 59:1276-1287
59. Steighner RJ, et al. Comparative identity and homogenic testing of the mtDNA HV1 region using denaturing gradient gel electrophoresis. *Journal of Forensic Sciences*.1999; 44:1186-1198
60. Tully LA et al. A sensitive denaturing gradient gel electrophoresis assay reveals a high frequency of heteroplasmy in hypervariable region 1 of the human mtDNA control region. *American Journal of Human Genetics*,2000; 67:432-443
61. Bar W, Brinkmann B, Budowle B, Carracedo A, Gill P, Holland M, Lincoln P, Mayr W, Morling N, Olaisen B, Schneider P, Tully G, Wilson M. DNA Commission of the International Society for Forensic Genetics: Guidelines for mitochondrial DNA typing. *Int J Legal Med*.2000;113:193-196
62. Bendal KE, Sykes BC. Length heteroplasmy in the first hypervariable segment of the human mtDNA control region. *American Journal of Human Genetics*.1995;57:248-256
63. Bendal KE et al. Heteroplasmic point mutations in the human mtDNA control region. *American Journal of Human Genetics*. 1996; 59:1276-1287
64. Steward JE, et al. Length variation in HV2 of the human mitochondrial DNA control region. *Journal of Forensic Science*.2001; 46: 862-870
65. Parson W, Bandelt HJ. Extended guidelines for mtDNA typing of population data in forensic science. *Forensic Science International: Genetics*. 2007; 1:13-19
66. Grzybowski T. Extremely high levels of human mitochondrial DNA heteroplasmy in single hair roots. *Electrophoresis*, 2000; 21:548-553
67. Budowle B, et al. Critique of interpretation of high levels of heteroplasmy in the human mitochondrial DNA hypervariable region I from hair. *Forensic Science International*, 2002; 126:30-33
68. Lagerstrom-Fermer M, et al. Heteroplasmy of the human mtDNA control region remains constant during life. *American Journal of Human Genetics*, 2001; 68:1299-1301
69. Brandstatter A, Parson W. Mitochondrial DNA heteroplasmy of artefacts- a matter of the amplification strategy? *International Journal of Legal Medicine*, 2003; 117:180-184

70. Marchington DR, Macauley V, Hartshorne GM, Barlow D, Poulton J. Evidence from human oocytes for a genetic bottleneck in an mtDNA disease. *Am J Hum Genet.*1998;63:769
71. Calloway CD, et al. The frequency of heteroplasmy in the HVII region of mtDNA differs across tissue types and increases with age. *American Journal of Human genetics*, 200; 66:1384-1397
72. Gill P, Ivanov P, Kimpton C, Piercy R, Benson N, Tully G, Evett I, Hagelberg E, Sullivan K. Identification of the remains of the Romanov family by DNA analysis. *Nature.*1994;6:130-135
73. Ivanov PL et al. Mitochondrial DNA sequence heteroplazmy in the Grand Duke of Russia Georgij Romanov establishes the authenticity of the remains of Tsar Nicholas II. *Nature Genetics.*1996; 12: 417-420
74. Bandelt.H.J, Parson W. Consistent treatment of length variants in the human mtDNA control region:a reappraisal. *Int.J.Legal Med.* 2008;122:11-21
75. Carracedo A, Bar W, Lincoln P, Mayer W, Morling N, Olaisen B, Schneider P, Budowle B, Brinkmann B, Gill P, Holland M, Tully G, Wilson M. DNA Commissiona of the International Society for Forensic Genetics: guidelines for mitochondrial DNA typing. *Forensic Science International.*2000.110:79-85
76. Tully G, Bar W, Brinkmann B et al. Considerations by the European DNA profiling (EDNAP) group on the working practices, nomenclature and interpretations of mitochondrial DNA profiles. *Forensic Sci Int.*2001;124:83-91
77. Brandstatter A et al. Mitochondrial DNA control region sequences from Nairobi (Kenya): Inferring phylogenetic parameters for establishing of a forensic database. *International Journal of Legal Medicine*, 2004; 118:294-306
78. Brandstatter A et al. generating population data for the EMPOP database-an overview of the mtDNA sequencing and data evaluation processes considering 273 Austrian control region sequences as example. *Forensic Science International*, 2007; 166:164-175
79. Irwin JA et al. Development and expansion of high-quality control region databases to improve forensic mtDNA evidence interpretation. *Forensic Science International:Genetics*, 2007; 1:154-157
80. Rock A, Irwin J, Dur A, Parson T, Parson W. SAM:String based sequence search algorithm for mitochondrial DNA database queries. *Forensic Science International:Genetics*, 2011; 5:126-132
81. Holland MM, Parson JT. Mitochondrial DNA sequence analysis-validation and use for forensic casework.*Forensic Science Review.*1999; 11:21-50

82. Coble MD et al. Mystery solved:The identification of the two missing Romanov children using DNA analysis. PLoS ONE.2009;4:e4838
83. Gill P et al. Establishing the identity of Anna Anderson Manahan. Nature Genetics.1995; 9:9-10 (Erratum in:Nature Genetics;9:218)
84. Koyama H, Iwasa M, Ohtani S, Ohira H, Tsuchimochi T, Maeno Y, Isobe Y, Nagao M. Personal Identification from Human Remains by Mitochondrial DNA Sequencing. The American Journal of Forensic Medicine and Pathology.2002;23(3):272-276
85. Melton T, Dimick G, Higgins B, Lindstrom L, Nelson K. Forensic Mitochondrial DNA Analysis of 691 Casework Hairs. J Forensic Sci.2005;50:1-8
86. Ginther C, Issel-Tarver L, King MC. Identifying Individuals by sequencing mitochondrial DNA from teeth. Nature Genetics.1992;2:135-138
87. Hopwood A, Mannucci A, Sullivan K. DNA typing from human faces. Int J Legal Med.1996;108:237-243
88. Hoppe JD, Kurth R, Sewing KF. Richtlinien für die Erstattung von Abstammungsgutachten. Deutsches Arzteblatt, Jg. 99, Heft. 10, 8. März 2002
89. Wallace DC et al. Mitochondrial DNA variation in human evolution and disease. Gene.1999; 238:211-230
90. Krings M et al. Neandertal DNA sequences and the origin of modern human. Journal of Forensic Sciences.1997; 90:19-30
91. Relethford JH. Reflection of our past: How human history is revealed in our genes. Boulder:Colorado:Westview press.2003
92. Brown K. Tangled roots? Genetics meets genealogy. Science.2002; 295:1634-1635
93. Cann RL, Stoneking M, Wilson AC. Mitochondrial DNA and human evolution. Nature.1987;325:31
94. Gonder MK, Mortensen HM, Reed FA, Sousa A, Tishkoff SA. Whole-mtDNA Genome Sequence Analysis of Ancient African Lineages. Mol. Biol. Evol. 2007; 24 (3): 757-768
95. Metspalu M, Kivisild T, Metspalu E, Parik J, Hudjashov G, Kaldma K, Serk P, Karmin M, Behar D, Gilbert TP, Endicot P, Mastana S, Papiha S, Skorecki K, Torroni A, Villems R. Most of the extant mtDNA boundaries in South and Southwest Asia were likely shaped during the initial settlement of Euroasia by anatomically modern humans. BMC Genetics. 2004; 5: 1-26

96. Brandstatter A, Parsons T, Parson W. Rapid screening of mtDNA coding region SNPs for the identification of west European Caucasian haplogroups. *Int J Legal Med.* 2003; 117:291-298
97. Brandstatter A, Salas A, Niederstatter H, Gassner C, Carracedo A, Parson W. Dissection of mitochondrial superhaplogroup H using coding region SNPs. *Electrophoresis* 2006; 27: 2541-2550
98. Zgonjanin D, Veselinovic I, Kubat M, Furach I, Antov M, Lonchar E, Tasich M, Vukovic R, Omorjan R. Sequence polymorphism of the mitochondrial DNA control region in the population of Vojvodina province, Serbia. *Legal Medicine.*2010; 12:104-107
99. Alvarez CJ, Johnson DLE, Lorente JA, Martinez-espín E, Martinez-Gonzalez LJ, Allard M et al. Characterization of human control region sequences for Spanish individuals in a forensic mtDNA data set. *Leg Med (Tokyo).*2007;9:293-304
100. Torroni A, Huoponen K, Francalacci P, Petrozzi M, Morelli L, Scozzari R et al. Classification of European mtDNA from an analysis of three European populations. *Genetics*;1996;144:1835-1850
101. Parson W, Dür A, EMPOP-A forensic mtDNA database, *For. Sci. Int. Genet.* 2007;1: 88-92
102. <http://empop.org>.2011
103. Wallace D, Brown M, Lott M. Mitochondrial DNA variation in human evolution and disease. *Gene.*1999; 238:211-230
104. Ruiz-Pesini E, Mishmar D, Brandon M, Procaccio V, Wallace DC. Effects of purifying and adaptive selection on regional variation in human mtDNA. *Science.* 2004; 303: 223-226
105. Zimmermann B, Anita Brandstatter, Nina Duftner, Daniela Niederwieser, Mirko Spiroski, Todor Arsov, Walther Parson. Mitochondrial DNA control region population data from Macedonia. *FSI Genetics.*2007;1:e4-e9
106. Burger MF, Song EY, Schumm W. Buccal DNA samples for DNA typing: new collection and processing methods. *BioTechniques.*2005; 39:257-261
107. Wilson MR, Polansky D, Butler J et al. Extraction, PCR amplification and sequencing of mitochondrial DNA from human hair shafts. *Biotechniques.*1995;18:662-669
108. Alonso A, Andelinovic S, Martin P, Sutlovic D, Erceg I, Huffine E, Fernandez de Simon L, Albarran C, Defins-Gojanovic M, Fernandez-Rodriguez A, Garcia P, Drmic I, Rezić B, Kuret S, Sancho M, Primorac D. DNA Typing Skeletal Remains: Evaluation of Multiplex and Megaplex STR Systems on DNA Isolated from Bone and Teeth Samples. *Croatian Medical Journal.* 2001; 42:260-266

109. Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR based typing from forensic material. *BioTechniques*.1991;10:506
110. Willard J, Lee D, Holland M. Recovery of DNA for PCR Amplification from Blood and Forensic Samples Using a Chelating Resin. *Forensic DNA Profiling Protocols. Methods in Molecular Biology* .1998; 98: 9-18
111. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf S, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. 1988; 239: 487-491
112. Zupanic Pajnic I, Balazic J, Komel R. Sequence polymorphism of the mitochondrial DNA control region in Slovenian population. *Int J Legal Med*. 2004;118:1-4
113. Werle E, Schneider C, Renner M et al. Convenient single-step, one tube purification of PCR products for direct sequencing. *Nucleic Acid Res*. 1994; 22:4354-4355
114. Brandstatter A, Sanger T, Lutz-Bonengel S, Parson W, Beraud-Colomb E, Wen B, Kong Q, Bravi C, Bandelt H. Phantom mutation hotspots in human mitochondrial DNA. *Electrophoresis*. 2005; 26: 3414-3429
115. Parson W, Bandelt H. Extended guidelines for mtDNA typing of population data in forensic science. *Forensic Science International:Genetics*. 2007; 1:13-19
116. Charles H.Brenner. Fundamental problem of forensic mathematics-The evidential value of a rare haplotype. *Forensic Science International*.2010; 4:281-291
117. Hoppe JD, Kurth R, Sewing KF. Richtlinien für die Erstattung von Abstammungsgutachten. *Deutsches Arzteblatt*, Jg. 99, Heft. 10, 8. März 2002
118. Charles Brenner.DNAVIEW User's Manuel
119. Parson W, Brandstatter A, Alonso A, Brandt N, Brinkmann B, Caraccedo A, Corach D, Froment O, Furac I, Grzybowski T, Hedberg K, Keyser-Tracqui C, Kupiec T, Lutz-Bobengel S, Mevag B, Ploski R, Schmitter H, Schneider P, Syndercombe-Court R, Sorensen E, Thew H, Tully G, Scheitauer R. The EDNAP mitochondrial DNA population database (EMPOP) collaborative exercise:organisation, results and perspectives. *Forensic Science International*. 2004; 139:215-226
120. S. Schneider, D. Roessli, L. Excoffier, Arlequin ver. 2.0: A Software for Population Genetic Data Analysis, Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland, 2000.

121. Excoffier L, Smouse P, Quattro J. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*. 1992; 131: 479-491
122. Reynolds J, Weir BS, Cockerham CC. Estimation for the coancestry coefficient: basis for a short-term genetic distance. *Genetics*. 1983; 105:767-779
123. Slatkin M. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics*. 1995; 139:457-462
124. Rock A, Dur A, Oven M, Parson W. Concept for estimating mitochondrial DNA haplogroups using a maximum likelihood approach (EMMA). *Forensic Science International: Genetics*. 2013; 7:601-609
125. <http://www.phylotree.org>
126. Oven M, Kayser M. Updated Comprehensive Phylogenetic Tree of Global Human Mitochondrial DNA Variation. *Human Mutation*. 2008; 30:E386-E394
127. Achilli A, Rengo C, Magri C, Battaglia V, Olivieri A, Scozzari R, Cruciani F, Zeviani M, Briem E, Carelli V, Moral P, Dugoujon JM, Roostalu U, Loogvali EL, Kivisild T, Bandelt HJ, Richards M, Villems R, Santachiara-Benerecetti S, Semino O, Torroni A. The Molecular Dissection of mtDNA Haplogroup H Confirms that the Franco-Cantabrian glacial refuge was a major source for the European gene pool, *Am. J. Hum. Genet.* 2004; 75:910-918
128. Quintana-Murci L, Semino O, Bandelt HJ, Passarino G, McElreavey K. Genetic evidence of an early exit of Homo sapiens from Africa through Eastern Africa. *Nat. Genet.* 1999; 23: 437-441
129. Chandrasekar A, Kumar S, Sreenath J, Sarkar BN, Urade BP. Updating phylogeny of mitochondrial DNA macrohaplogroup m in India: dispersal of modern humans in South Asian corridor. *PloS One*. 2009; 4:7447
130. Malyarchuk BA, Perkova MA, Derenko MV, Vanecek T, Lazur J. Mitochondrial DNA variability in Slovaks, with application to the Roma origin. *Ann. Hum. Genet.* 2008; 72:228-240
131. Quintana-Murci L, Chaix R, Wells RS, Behar DM, Sayar H. where west meets east: the complex mitochondrial landscape of the southwest and central Asian corridor. *Am. J. Hum. Genet.* 2004; 74:827-845.
132. Sun C, Kong QP, Palanichamy MG, Argawal S, Bandelt HJ. The dazzling array of basal branches in the mtDNA macrohaplogroup M from India as inferred from complete genomes. *Mol. Biol. Evol.* 2006; 23:683-690

133. Thangaraj K, Chaubey G, Singh VK, Vanniarajan A, Thanseem I. In situ origin of deep rooting lineages of mitochondrial macrohaplogroup M in India. *BMC Genomics* 2006; 7:151
134. Richards M, Macaulay V, Torroni A, Bandelt HJ. In search of geographical patterns in European mitochondrial DNA. *Am. J. Hum. Genet.* 2002; 71:1168-1174
135. Malyarchuk B, Grzybowski T, Derenko M, Czarny J, Drobnic K, Misicicka-Sliwka D. Mitochondrial DNA Variability in Bosnians and Slovenians. *Annals of Human Genetics* 2003; 67:412-425
136. Gresham D, Morar B, Underhill PA, Passarino G, Lin AA, Wise C, Angelicheva D, Calafel F, Oefner PJ, Shen P, Tournev I, de Pablo R, Kuchinskas V, Perez-Lezaun A, Marushiakova E, Popov V, Kalaydjiev L. Origins and divergence of the Roma. Gypsies. *Am. J. Hum. Genet.* 2001; 69:1314-1331
137. Irwin J, Saunier J, Strouss K, Paintner C, Diegoli T, Sturk K, Kovatski L, Brandstatter A, Cariolou M, Parson W, Parsons T. Mitochondrial control region sequences from northern Greece and Greek Cypriots. *Int J Legal Med.* 2008; 122:87-89
138. Bandelt H, Parson W. Consistent treatment of length variants in the human mtDNA control region: a reappraisal. *Int. J. Legal Med.* 2008; 122: 11-21
139. Soneking M, Hedgecock D, R.G. Higuchi, L. Vigilant, H.A. Erlich, Population variation of human mtDNA control region sequences detected by enzymatic amplification and sequence-specific oligonucleotide probes, *Am. J. Hum. Genet.* 1991; 48 (2): 370-382.
140. Brandstatter A, Egyed B, Zimmermann B, Tordai A, Padar Z, Parson W. Mitochondrial DNA control region variation in Ashkenazi Jews from Hungary. *Forensic Science International: Genetics.* 2008; 2: e4-e6
141. Irwin J, Egyed B, Saunier J, Szamosi G, O'Callagan J, Padar Z, Parsons T. Hungarian mtDNA population databases from Budapest and the Baranya country Roma. *Int J Legal Med.* 2007; 121:377-383
142. Brandstatter A, Egyed B, Zimmermann B, Duftner N, Padar Z, Parson W. Migration Rates and Genetic Structure of two Hungarian Ethnic Groups in Transylvania, Romania. *Annals of Human Genetics.* 2007; 71:1-13
143. Salihovic M, Baresic A, Klaric I, Cukrov S, Lauc L, Janicevic B. The Role of the Vlach Roma in Shaping the European Romani Maternal Genetic History. *American Journal of Physical Anthropology* 2011; 146:262-270